

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIELE MARX KOENE

**GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA DE ESPÉCIES DA SUBTRIBO  
PLEUROTHALLIDINAE (ORCHIDACEAE).**

CURITIBA

2017

FRANCIELE MARX KOENE

**GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA DE ESPÉCIES DA SUBTRIBO  
PLEUROTHALLIDINAE (ORCHIDACEAE).**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Botânica, no Programa de Pós-Graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Lopes Fortes Ribas  
Co-orientadora: Profa. Dra Erika Amano

CURITIBA  
2017

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Koene, Franciele Marx

Germinação assimbiótica de espécies da subtribo pleurothallidinae  
(Orchidaceae)./ Franciele Marx Koene. – Curitiba, 2017.  
70 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Luciana Lopes Fortes Ribas

Co-orientadora: Erika Amano

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

1. Orquidea. 2. Sacarose. 3. Carvão vegetal. I. Título II. Ribas, Luciana  
Lopes Fortes. III. Amano, Erika. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor  
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

CDD (20. ed.) 584.15




UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Botânica



321<sup>a</sup>.  
2017

Ata de Julgamento da Dissertação de Mestrado do pós-graduando **Franciele Marx Koene**. Aos vinte e seis dias do mês de setembro do ano de 2017, às quatorze horas, na presença da Comissão Examinadora, composta pela Dr<sup>a</sup> Luciana Lopes Fortes Ribas, pelo Dr. Rogério Mamoru Suzuki e pelo Dr. Luiz Antonio Biasi, foi aberta a sessão de julgamento da Dissertação intitulada: "**GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA DE ESPÉCIES DA SUBTRIBO PLEUROTHALLIDINAE (ORCHIDACEAE)**". Após a apresentação, perguntas e esclarecimentos acerca da Dissertação, a Comissão Examinadora **APROVA O TRABALHO DE CONCLUSÃO** do(a) aluno(a) **Franciele Marx Koene**. Nada mais havendo a tratar, encerrou-se a sessão da qual foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos componentes da Comissão Examinadora.

  
Dr<sup>a</sup> Luciana Lopes Fortes Ribas (UFPR)

  
Dr. Rogério Mamoru Suzuki (IBT-SP)

  
Dr. Luiz Antônio Biasi (UFPR)



## AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus, pelas oportunidades que tive em minha vida e por me dar forças nos momentos difíceis.

À minha família peço desculpas pela minha ausência, e agradeço pela paciência e motivação, em especial ao meu esposo Misael pelo incentivo, ajuda, carinho, respeito e compreensão em todos os momentos.

À minha orientadora Dra. Luciana, junto com minha co-orientadora Dra. Erika, pela orientação, por toda ajuda e ensinamentos, paciência e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório, Rodrigo, Sheila, Fabricia, Jean, Julio e em especial a Isabele e a Damaris, obrigada por tudo!

As minhas amigas e companheiras de incansáveis viagens até Curitiba, Juliana e Luciana Ribeiro, obrigada pela bela amizade que construímos e pela força nos momentos que mais precisei. Também quero agradecer a Jaqueline por me ajudar durante a pesquisa e me acolher inúmeras vezes em sua casa.

Ainda, quero agradecer as minhas amigas e colegas: Rosane, Juliana, Célia, Claudia, Daniele e em especial a Francieli Fallgatter pelo apoio e pela disponibilidade em sempre me ajudar nas trocas de turnos para que eu pudesse me deslocar à Curitiba!

E para finalizar, não posso deixar de agradecer ao Nilson por toda ajuda no laboratório de anatomia, ao Fabiano pela ajuda com a estatística, à querida Professora Marguerite pelas correções realizadas e a todos os colaboradores da UFPR que de alguma forma me ajudaram durante esses dois anos. Muito obrigada!!

## RESUMO

A subtribo Pleurothallidinae Lindl. é formada por espécies que correm risco de extinção pela degradação da Mata Atlântica. As suas sementes são muito pequenas e não contêm reservas nutritivas. A germinação na natureza necessita de simbiose das sementes com fungos micorrízicos específicos. Os estudos de germinação assimbiótica e de cultivo dessas espécies são escassos. O objetivo deste estudo foi analisar as características morfológicas e morfométricas das sementes e embriões de 11 espécies de micro-orquídeas para relacionar com a germinação *in vitro* e estabelecer um protocolo de propagação de mudas de *Acianthera prolifera*. Sementes de espécies de Pleurothallidinae foram utilizadas para estudos morfológicos e morfométricos, com auxílio de microscópio óptico e de microscopia eletrônica de varredura. As características das sementes analisadas foram: cor, forma, ornamentação, formato da parede das células, abertura micropilar e presença de depósito cuticular envolvendo o embrião. Também foram analisadas medidas quantitativas nas sementes e embriões, tais como: comprimento, largura, volume e porcentagem de espaço de ar. A análise de dados morfológicos e morfométricos auxiliaram no entendimento do processo germinativo das espécies estudadas. A viabilidade das sementes foi avaliada pela germinação *in vitro* em meio de cultura WPM, por um período de duas a 24 semanas. As melhores respostas de germinação ocorreram com *A. prolifera* (92%) e *Acianthera ochreatea* (86%), com a formação de plântulas após 90 e 120 dias da sementeira. As sementes e embriões dessas espécies eram maiores que as outras e apresentaram polaridade estrutural que pode ter facilitado à germinação. Por outro lado, as piores respostas ocorreram com *Pabstiella fusca* (4%), que continha as menores sementes e embriões, sem ocorrência de polaridade estrutural e os seus protocormos necrosaram após 90 dias de cultivo em meio WPM. Os dados morfométricos avaliados demonstraram variações dentro do gênero *Acianthera* sp. e entre as espécies. Para estabelecimento de um protocolo de germinação assimbiótica de *A. prolifera*, sementes maduras foram inoculadas em quatro meios de cultura: WPM, MS, MS/2 e KC. As avaliações dos estádios de desenvolvimento de protocormos até a formação de plântulas foram realizadas por um período de duas a 16 semanas. Os resultados demonstraram que o meio MS/2 foi eficiente no início da germinação e o WPM para o desenvolvimento dos protocormos até a formação das plântulas de *A. prolifera*. Para estimular o crescimento dos protocormos foi testado o efeito do carvão ativado (0, 1, 2 e 4 g L<sup>-1</sup>) e da sacarose (0, 15, 30 e 60 g L<sup>-1</sup>) nos meios de cultura MS/2 e WPM. O desenvolvimento de protocormos e plântulas apresentaram melhores respostas em meio de cultura WPM contendo 1 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado. Os meios suplementados com sacarose estimularam o crescimento das plântulas, após subcultivo para os mesmos meios, sendo que para a formulação WPM foi recomendado adicionar 60 g L<sup>-1</sup> e para MS/2 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose. As mudas de *A. prolifera* foram aclimatizadas com sucesso (95% de sobrevivência) utilizando a mistura comercial de fibra de coco, casca de *Pinus* e carvão vegetal, combinada com vermiculita (1:1) após 12 semanas de cultivo em casa de vegetação.

**Palavras- chave:** meios de cultura, micro-orquídeas, carvão ativado, sacarose.

## ABSTRACT

The subtribe Pleurothallidinae Lindl. consists of 5,100 species distributed in the neotropics that are in danger of extinction due to the degradation of the Atlantic Forest. Its seeds are very small and contain no nutritional reserves. Germination in nature requires symbiosis with specific mycorrhizal fungi. Studies of asymbiotic germination and cultivation of these species are scarce. The objective of this study was to analyze the morphological and morphometric characteristics of the seeds and embryos of 11 species of micro-orchids in order to understand the process that control *in vitro* germination and also to establish a protocol for the propagation of *Acianthera prolifera* seedlings. Seeds of Pleurothallidinae species were used for these studies, carried out with the aid of an optical microscope and scanning electron microscopy. The characteristics of the analyzed seeds were: color, shape, ornamentation, cell wall format, micropillary aperture and presence of cuticular deposit. Quantitative measures were also recorded in seeds and embryos, such as: length, width, volume and percentage of air space. The analysis of morphological and morphometric data helped to understand the germination process of the species studied. The viability of the seeds was evaluated by the tetrazolium test and by *in vitro* germination in WPM culture medium, for a period of two to 24 weeks. The best germination responses occurred with *A. prolifera* (92%) and *Acianthera ochreatea* (86%), with formation of seedlings after 90 and 120 days of sowing. The seeds and embryos of these species were larger than the others and presented structural polarity that may have facilitated the germination. On the other hand, the worst responses occurred with *Pabstiella fusca* (4%), which contained the smallest seeds and embryos, without occurrence of structural polarity and the protocorms died after 90 days of culture in WPM medium. The morphometric data showed variations within the genus *Acianthera* sp. and among the species. To establish an asymbiotic germination protocol for *A. prolifera*, mature seeds were inoculated in four culture media: WPM, MS, MS/2 and KC. The evaluations of the developmental stages of protocorms until the formation of seedlings were carried out for a period of two to 16 weeks. The results showed that the MS/2 medium was efficient at the beginning of germination and the WPM for the development of the protocorms until the formation of the seedlings. The effect of activated charcoal (0, 1, 2 and 4 g L<sup>-1</sup>) and sucrose (0, 15, 30 and 60 g L<sup>-1</sup>) on the MS/2 and WPM culture media was tested to stimulate the growth of protocorms. The development of protocorms and seedlings presented better responses in WPM culture medium with 1 g L<sup>-1</sup> of activated charcoal. The media supplemented with sucrose stimulated the growth of the seedlings after subculture to the same media. For WPM formulation it is recommended to add 60 g L<sup>-1</sup> sucrose and, for MS/2, 15 g L<sup>-1</sup>. The seedlings of *A. prolifera* were successfully acclimatized (95% survival) after 12 weeks of greenhouse cultivation in a commercial mixture of coconut fiber, pine bark, and charcoal combined with vermiculite (1:1).

**Key words:** culture media, micro-orchids, activated charcoal, sucrose.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1. Sementes de espécies de Pleurothallidinae observadas em Microscopia Eletrônica de Varredura. ....	26
Figura 2 – Germinação <i>in vitro</i> e desenvolvimento de protocormos de <i>Acianthera ochreatea</i> .....	32
Figura 3 – Frequência (%) dos estádios de desenvolvimento dos protocormos de espécies de Pleurothallidinae, cultivados <i>in vitro</i> por duas, quatro, seis, oito, doze e dezesseis semanas em meio de cultura WPM.....	33

### CAPÍTULO II

Figura 1– Germinação <i>in vitro</i> de <i>Acianthera prolifera</i> .....	59
Figura 2 – Frequência (%) dos estádios de desenvolvimento dos protocormos de <i>Acianthera prolifera</i> , cultivados <i>in vitro</i> por duas (a), quatro (b), seis (c), oito (d) e dezesseis (e) semanas em diferentes meios de cultura.....	60
Figura 3 – Alongamento e desenvolvimento de plântulas de <i>Acianthera prolifera</i> provenientes da germinação <i>in vitro</i> após três meses de cultivo em meio de cultura WPM e MS/2, acrescido de carvão ativado.....	61
Figura 4 – Alongamento e desenvolvimento de plântulas de <i>Acianthera prolifera</i> provenientes da germinação <i>in vitro</i> após seis meses de cultivo em meio de cultura WPM e MS/2, acrescido de sacarose.....	62
Figura 5 – Secções longitudinais da semente e de protocormos de <i>Acianthera prolifera</i> corados com azul de toluidina.....	63



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1 – Espécies da subtribo Pleurothallidinae utilizadas como material vegetal.....	22
Tabela 2 – Principais características morfológicas das sementes de espécies da subtribo Pleurothallidinae.....	25
Tabela 3 – Dados morfométricos das sementes de espécies de Pleurothallidinae....	27
Tabela 4 – Dados morfométricos de embriões de espécies da subtribo Pleurothallidinae e porcentagem de ar entre a testa e o embrião das sementes.....	28
Tabela 5 – características anatômicas da testa de sementes, das células dos embriões, presença ou ausência do suspensor e de cutícula em espécies da subtribo Pleurothallidinae.....	29
Tabela 6 – Porcentagem de germinação após 30, 60 e 90 dias da semeadura <i>in vitro</i> , em meio de cultura WPM e o tempo médio necessário para atingir os estádios de desenvolvimento dos protocormos de espécies de Pleurothallidinae.....	30

### CAPÍTULO II

Tabela 1– Germinação de sementes e estádios de desenvolvimento dos protocormos de <i>Acianthera prolifera</i> .....	64
Tabela 2 – Porcentagem total de sementes germinadas de <i>Acianthera prolifera</i> , cultivadas em diferentes meios de cultura durante duas, quatro, seis, oito e doze semanas de cultivo <i>in vitro</i> .....	64
Tabela 3 – Índice de velocidade de germinação (ivg) de sementes de <i>Acianthera prolifera</i> , cultivadas em diferentes meios de cultura durante duas, quatro, seis, oito e doze semanas de cultivo <i>in vitro</i> .....	64
Tabela 4 – Sobrevivência de plantas de <i>Acianthera prolifera</i> , cultivadas em diferentes substratos e mantidas em casa de vegetação, após doze semanas de aclimatização.....	64

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO I - ESTUDOS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DE SEMENTES E GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA DE ESPÉCIES DE PLEUROTHALLIDINAE.....</b>	<b>19</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>19</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>20</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
2.1 MATERIAL VEGETAL .....	22
2.2 ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS DAS SEMENTES.....	23
2.3 VIABILIDADE DAS SEMENTES .....	23
<b>2.3.1 Teste do tetrazólio.....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.2 Germinação <i>in vitro</i>.....</b>	<b>24</b>
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	24
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS DAS SEMENTES.....	25
3.1.1 Descrições anatômicas .....	28
3.2 GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	29
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>38</b>
<b>CAPÍTULO II - Germinação assimbiótica de sementes e desenvolvimento de plântulas de <i>Acianthera prolifera</i> (Orchidaceae).....</b>	<b>41</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>41</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>42</b>
<b>1.Introdução.....</b>	<b>43</b>
<b>2. Material e métodos.....</b>	<b>44</b>
2.1 <i>Material vegetal</i> .....	44
2.2 <i>Teste de viabilidade do tetrazólio (TZ)</i> .....	44
2.3 <i>Germinação in vitro</i> .....	45
2.4 <i>Alongamento e desenvolvimento da parte aérea do caule e raízes</i> .....	45
2.5 <i>Transplântio e aclimatização das mudas</i> .....	46
2.6 <i>Condições de cultivo</i> .....	46

2.7 Análises histológicas .....	46
2.8 Análise estatística .....	47
<b>3. Resultados .....</b>	<b>47</b>
3.1 Teste de viabilidade e germinação <i>in vitro</i> .....	47
3.2 Alongamento e desenvolvimento da parte aérea do caule e raízes .....	49
3.2.1 Efeito do carvão ativado .....	49
3.2.2 Efeito da sacarose .....	49
3.3 Transplântio e aclimatização das mudas.....	50
3.4 Análises histológicas .....	50
<b>4. Discussão .....</b>	<b>50</b>
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>54</b>
<b>6. Referências bibliográficas.....</b>	<b>54</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS FINAIS.....</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Orchidaceae representa uma das maiores famílias das Angiospermas (APG III 2009), com 221 gêneros e 2500 espécies no Brasil (BARROS *et al.*, 2015). Segundo Pridgeon *et al.* (1999), a família Orchidaceae foi subdividida em cinco subfamílias, sendo a Epidendroideae, a maior delas. Possui cerca de 650 gêneros e mais de 18.000 espécies, subdividida em 16 tribos, com a Epidendreae sendo a maior, com cerca de 5.870 espécies e dividida em seis subtribos, entre elas a Pleurothallidinae (PRIDGEON *et al.*, 2005).

Pleurothallidinae é constituída de plantas terrícolas, rupícolas ou epífitas, de crescimento simpodial, com aproximadamente 36 gêneros e 5100 espécies (KARREMANS, 2016), distribuídas do Sul da Flórida, México, ao Sul do Brasil e Argentina, sendo que as regiões mais ricas em espécies são Colômbia, Equador e Peru (PRIDGEON *et al.*, 2005). No Brasil, muitas de suas espécies estão restritas a um dos biomas mais ameaçados do planeta, a Floresta Atlântica, considerada um dos locais mundiais de biodiversidade, definidos como regiões que concentram grande riqueza de espécies e endemismos, mas que tiveram sua área original reduzida em mais de 70% (MYERS *et al.*, 2000; MENINI NETO e DOCHA NETO, 2009). É representada por gêneros como: *Acianthera* Scheidw, *Octomeria* R. Br., *Stelis* Sw., entre outros (GOMES, 2005). De um modo geral, as espécies dessa subtribo, conhecidas popularmente como micro-orquídeas, não apresentam grande apelo ornamental, devido às dimensões reduzidas das plantas e de suas flores, além da dificuldade de cultivo, minimizando a pressão exercida pelos colecionadores (MENINI NETO e DOCHA NETO, 2009). Não existem recomendações para o cultivo de espécies dessa subtribo. Suas espécies possuem como característica a ausência de pseudobulbo e a parte ereta do caule que sustenta a folha não é espessada, recebendo o nome de “ramicaule” (STERN e PRIDGEON, 1984).

As orquídeas, em geral, apresentam sementes leves, com formas ovais a elipsoides e ausência de endosperma (PRIDGEON *et al.*, 1999). Por não possuírem reservas, a germinação na natureza ocorre somente após a infecção por um fungo micorrízico específico (SEATON *et al.*, 2013). As sementes e embriões de diferentes gêneros e espécies de orquídeas apresentam grande variação em tamanho, forma, coloração e volume (HEALEY *et al.*, 1980). A forma da semente e as projeções da

testa podem facilitar a aderência às superfícies ou a absorção de umidade (PRIDGEON *et al.*, 1999). A superfície das sementes pode apresentar ou não ornamentações, que facilitam a dispersão pelo vento ou água, favorecendo a flutuação, entretanto, também podem dificultar a entrada de água para a germinação ocorrer (ARDITTI, 1990). Estudos morfológicos e morfométricos das sementes e de protocormos em vários estádios até a formação de plântulas são escassos e podem contribuir para o entendimento do processo de germinação assimbiótica e produção de mudas de espécies da subtribo Pleurothallidinae.

A germinação *in vitro* de orquídeas foi desenvolvida por Knudson (1922) e foi considerada uma alternativa viável para acelerar a germinação de espécies de orquídeas na ausência de fungos micorrízicos. Vários tipos de meios de cultura vêm sendo utilizados para a germinação e produção de mudas de orquídeas, em grande escala, como as formulações: KC (KNUDSON, 1946), MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e MS/2 (MS, com a concentração de sais reduzida pela metade). O meio de cultura WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980), proposto para o cultivo de espécies lenhosas foi recomendado para a propagação *in vitro* de algumas espécies de orquídeas, como: *Brasilidium forbesii* (GOMES *et al.*, 2015), *Brasiliorchis picta* (SANTOS *et al.*, 2016) e *Hadrolaelia grandis* (VUDALA e RIBAS, 2017). Estudos têm demonstrado que nem sempre o melhor meio para a germinação inicial foi o ideal para o desenvolvimento das plântulas (KAUTH *et al.*, 2008).

Para estimular maior desenvolvimento de protocormos e plântulas é necessário modificação ou complementação do meio de cultura com compostos adicionais. O papel de carboidratos, no desenvolvimento de plântulas de orquídeas, tem sido estudado, uma vez que as mesmas têm poucas reservas, sendo necessário um suprimento exógeno (KAUTH *et al.*, 2008). Eles exercem um papel importante nas culturas *in vitro*, como fonte de carbono e energia e também como agente osmótico (THORPE *et al.*, 2008). A sacarose é um dos açúcares mais utilizados no meio de cultura e sua adição é essencial para o crescimento *in vitro* e o desenvolvimento de plantas, com a concentração ideal variando entre espécies de orquídeas, como por exemplo: 10 g L<sup>-1</sup> para *Cypripedium macranthos* Sw. (HUW *et al.*, 2016), 20 g L<sup>-1</sup> para o híbrido de *Phalaenopsis* “Pink” (ZAHARA *et al.*, 2017), 10 a 30 g L<sup>-1</sup> para *Alatiglossum fuscopetalum* (FERREIRA *et al.*, 2017) ou 40 g L<sup>-1</sup> para *Phalaenopsis cornu-cervi* (RITTIRAT *et al.*, 2012). O uso de carvão ativado também vem sendo testado em meio de cultura de germinação e para promover o



desenvolvimento de protocormos de muitas espécies de orquídeas, podendo ter efeito benéfico ou também prejudicial (PAN e VAN STADEN, 1998; SCHNEIDERS *et al.*, 2012).

A técnica de semeadura *in vitro* de orquídeas possibilita o aproveitamento máximo de sementes, no entanto, esse processo tem como desvantagem a necessidade de um período de aclimatização, sendo necessário que a plântula habite um substrato que lhe propicie boas condições para o seu melhor desenvolvimento (MORAES *et al.*, 2002). Vários substratos alternativos ao xaxim, que se encontra em risco de extinção, estão sendo testados, entre eles, a fibra de coco, pó de coco, casca de pinus e vermiculita (MACEDO *et al.*, 2014).

A maioria dos estudos priorizam otimizar as condições de cultivo *in vitro* para espécies com valor ornamental ou comercial (PAUL *et al.*, 2012; MOHANTY *et al.*, 2012) e não se concentram em espécies nativas menos significativas do ponto de vista econômico (ARDITTI e ERNEST, 1992), mas muito importantes para a conservação da diversidade genética e dinâmica do ecossistema, como as espécies da subtribo Pleurothallidinae.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo geral analisar características morfológicas e morfométricas das sementes, protocormos e plântulas e verificar influências na germinação *in vitro* de espécies da Subtribo Pleurothallidinae, para estabelecer um protocolo de produção de mudas de *Acianthera prolifera*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade das sementes pelo teste do tetrazólio e germinação assimiótica;

- Realizar caracterização morfológica e morfométrica de sementes de 11 espécies da subtribo Pleurothallidinae para verificar a sua influência na germinação assimbiótica;
- Avaliar a influência do meio de cultura, do carvão ativado e da sacarose na germinação assimbiótica e no crescimento e desenvolvimento das plântulas de *A. prolifera*;
- Selecionar o melhor substrato para transplântio e aclimatização de mudas de *A. prolifera* e
- Realizar a descrição anatômica da semente e dos estádios de protocormos até a formação de plântulas no cultivo *in vitro* de *A. prolifera*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 105-121, 2009.
- ARDITTI, J. **Orchid biology: reviews and perspectives**, v. 5. Portland: Timber Press, 1990. p. 159-206.
- ARDITTI, J.; ERNEST. R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley and Sons. 1992. 682 p.
- BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C.O.; GUIMARÃES, L.R.S. 2015. Orchidaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>> Acesso em: 11 set. 2017.
- FERREIRA, W. M.; VASCONCELOS, M. C.; SILVA, C. C. N.; OLIVEIRA, H. R.; SUZUKI, R. M. Asymbiotic germination, multiplication and development of *Alatiglossum fuscopetalum* (Orchidaceae) as affected by culture médium, sucrose and growth regulators. **Iheringia**, v. 72, p. 57-65, 2017.
- GOMES, R. S. Artificial key to the genera of Pleurothallidinae. In: PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P.J.; CHASE, M.W.; RASMUSSEN, F.N. **Genera Orchidacearum**. v. 4. New York: Oxford University Press, 2005. p. 325-328.
- GOMES, L. R. P; FRANCESCHI, C. R. B.; RIBAS, L. L. F. Micropropagation of *Brasiliidium forbesii* (Orchidaceae) through transverse and longitudinal thin cell layer culture. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 37, n. 2, p. 143-149, 2015.
- HEALEY, P. L.; MICHAUD, J. D.; ARDITTI, J. Morphometry of orchid seeds. III. Native California and related species of *Goodyera*, *Piperia*, *Platanthera* and *Spiranthes*. **American Journal of Botany**, p. 508-518, 1980.
- HUH, Y. S.; LEE, J. K.; NAM, S. Y.; HONG, E. Y.; PAEK, K. Y.; SON, S. W. Effects of altering medium strength and sucrose concentration on *in vitro* germination and seedling growth of *Cypripedium macranthos* Sw. **Journal Plant Biotechnology**, v. 43, p. 132-137, 2016.
- KAUTH, P. J.; DUTRA, D.; JOHNSON, T. R.; STEWART, S. L.; KANE, M. E.; VENDRAME, W. A. Techniques and applications of in vitro orchid seed germination. In: TEIXEIRA DA SILVA, J. A. (Ed.) **Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues**. Isleworth: Global Science Books, 2008. p. 375-391.
- KARREMANS, A. P. Genera Pleurothallidarum: an updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae. **Lankesteriana**, v.16, n.2, p.219 - 241, 2016.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.

LLOYD, G.; McCOWN, B. H. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society**, v. 30, p.421-427, 1980.

MACEDO, M. C., ROSA, D. B. C. J., SOARES, J. S., TATARA, M. B., HOFFMANN, N. T. K.; ROSA, Y. B. C. J. Armazenamento de sementes e aclimatização de *Brassavola tuberculata* Hook. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n.6, p. 2883-2894, 2014.

MENINI NETO, L; DOCHA NETO. A. Redescoberta e tipificação de *Octomeria leptophylla* Barb. Rodr. (Orchidaceae), micro-orquídea endêmica de Minas Gerais, Brasil. **Rodriguesia**, v. 60, n. 2, p. 461-465, 2009.

MORAES, L.M.; CAVALCANTE, L.C.D.; FARIA, R.T. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, p. 1397-1400, 2002.

MOHANTY, P.; DAS, M. C.; KUMARIA, S.; TANDON, P. High-efficiency cryopreservation of the medicinal orchid *Dendrobium nobile* Lindl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, n. 2, p. 297-305. 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

PAN, M.J., VAN STADEN, J. The use of charcoal in vitro culture – a review. **Plant Growth Regulation**, v. 26, p.155–163, 1998.

PAUL, S; KUMARIA, S; TANDON, P. An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale *in vitro* regeneration of *Dendrobium hookerianum*, a threatened orchid of northeast India. **AoB Plants**, v.2012, plr. 032, 2012.

PRIDGEON, A. M.; BLANCO, M.; GOMES, R.S; GRAYER, R; HERMANS, J; STENZEL, H; VEITH, N. C. Subtribe Pleurothallidinae. In: PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M.W; RASMUSSEN, F. N. (eds.). **Genera Orchidacearum**. New York: Oxford University Press, 2005. p. 319-422.

PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P.J.; CHASE, M.W.; RASMUSSEN, F.N. **Genera Orchidacearum**. Oxford: Oxford University Press, 1999.

RITTIRAT, S.; THAMMASIRI, K.; TE-CHATO, S. Effect of media and sucrose concentrations with or without activated charcoal on the plantlet growth of *P. cornu-cervi* (Breda) Blume & Rchb.f. **Journal of Agricultural Technology**, v. 8, p. 2077-2087, 2012.

SANTOS, S. A.; SMIDT, E. C.; PADIAL, A. A.; RIBAS, L. L. F. Asymbiotic seed germination and in vitro propagation of *Brasiliorchis picta*. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, p.134-144, 2016.

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, v. 59, n. 2, p.185-191, 2012.

SEATON, P.; KENDON, J. P.; PRITCHARD, H. W. PUSPITANINGTYAS, D. M.; MARKS, T. R. Orchid conservation: the next ten years. **Lankesteriana**, v.13, p. 93-103, 2013.

STERN, W. L.; PRIDGEON, A. M. Ramicaul, a better term for the pleurothallid "secondary stem". **American Orchid Society Bulletin**, v. 53, n.4, p. 397-401, 1984.

THORPE, T.; STASOLLA, C.; YEUNG, E. C, KLERK, G. J de, ROBERTS, A; GEORGE, E. F.. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: GEORGE, E.F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3 ed; Dordrecht: Springer, 2008. p. 115-173.

VUDALA, S. M.; RIBAS, L. L. F. Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae). **South African Journal of Botany**, v.108, p.1-7, 2017.

ZAHARA, M.; DATTA, A.; BOONKORKAEV, P.; MISHRA, A. The effects of different media, sucrose concentrations and natural additives on plantlet growth of *Phalaenopsis* hybrid "Pink". **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, e160149, 2017.



## CAPÍTULO I

### ESTUDOS MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DE SEMENTES E GERMINAÇÃO ASSIMBIÓTICA DE ESPÉCIES DE PLEUROTHALLIDINAE

#### RESUMO

As espécies da subtribo Pleurothallidinae são conhecidas como micro-orquídeas, devido ao pequeno tamanho das plantas e os estudos de germinação assimbiótica e cultivo dessas espécies são escassos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi analisar as características morfológicas e morfométricas de sementes de 11 espécies da subtribo Pleurothallidinae para entender melhor o processo de germinação *in vitro* e estabelecer um protocolo de produção de mudas. Dados qualitativos e quantitativos foram analisados nas sementes com auxílio de microscopia de luz e de varredura. As sementes foram caracterizadas quanto à cor, forma, ornamentação, formato da parede das células, abertura micropilar e presença de cutícula envolvendo o embrião. Também foram avaliadas medidas quantitativas nas sementes e embriões, tais como: comprimento, largura, volume e porcentagem de espaço de ar entre o tegumento e o embrião. Os dados morfométricos avaliados demonstraram variações dentro do gênero *Acianthera* sp. e entre as espécies. A viabilidade das sementes foi avaliada pela germinação *in vitro* e análise dos estádios de desenvolvimento dos protocormos até formação de plântulas, em meio de cultura WPM, por um período de duas a 24 semanas. As melhores respostas de porcentagem de germinação foram obtidas com *Acianthera prolifera* (92%) e *Acianthera ochreatea* (86%) e também do desenvolvimento dos protocormos, com a formação de plântulas após 90 e 120 dias da sementeira, respectivamente. As sementes e embriões dessas espécies eram maiores (comprimento, largura e volume) do que as outras e apresentaram polaridade estrutural que pode ter facilitado a sua germinação. Outras características das sementes de *A. prolifera* que podem ter auxiliado nesse processo foram: a presença de testa fina, sem ornamentação, e de um suspensor. Os protocormos de *Anathalis obovata*, *Dryadella liliputiana* e *Octomeria gracillis* apresentaram desenvolvimento lento em meio de cultura WPM, não atingindo o estágio de plântula num período de 180 dias de cultivo. As piores respostas germinativas foram observadas com *Pabstiella fusca* (4%), na qual as sementes e embriões eram menores, sem polaridade estrutural, sendo que os protocormos necrosaram após 90 dias de cultivo. As análises morfológicas e morfométricas contribuíram para o entendimento do processo germinativo de algumas espécies de micro-orquídeas, sendo necessários mais estudos testando outras formulações e complementos de meios de cultura, para acelerar o crescimento das plântulas e de produção de mudas, possibilitando a conservação dessas espécies.

**Palavras – chave:** Orchidaceae, micro-orquídeas, germinação *in vitro*, meio de cultura WPM.

## ABSTRACT

The species of the subtribe Pleurothallidinae are known as micro-orchids due to the small size of the plants and the studies of asymbiotic germination and cultivation of these species are scarce. The objective of this study was to analyze the morphological and morphometric characteristics of seeds of 11 species of the subtribe Pleurothallidinae in order to understand the *in vitro* germination process and to establish a seedling production protocol. Qualitative and quantitative data of the seeds were analyzed with the aid of an optical microscope and a scanning electron microscopy. The characteristics of the analyzed seeds were: color, shape, ornamentation, cell wall format, micropillary aperture and presence of cuticular deposit. Quantitative measures were also recorded in seeds and embryos, such as: length, width, volume and percentage of air space between the testa and the embryo. The morphometric data showed variations within the genus *Acianthera* sp. and between species. The viability of the seeds was evaluated by *in vitro* germination and by analysis of the developmental stages of protocorms until seedling formation in WPM culture medium, for a period of two to 24 weeks. The best responses of germination rate were obtained for *Acianthera prolifera* (92%) and *Acianthera ochreatea* (86%) and also the development of protocorms, with the formation of seedlings after 90 and 120 days of sowing, respectively. The seeds and embryos of these species were larger (length, width and volume) than the others and presented structural polarity that may have facilitated their germination. Other characteristics of *A. prolifera* seeds that may have contributed to this process were: the presence of a thin testa, without ornamentation, and a suspensor. *Anathalis obovata*, *Dryadella liliputiana* and *Octomeria gracillis* protocorms showed slow development in WPM medium, not reaching the seedling stage in a period of 180 days of cultivation. The worst responses was of *Pabstiella fusca* (4%), which produced the lowest number of seeds and embryos, without occurrence of structural polarity, and the protocorms died after 90 days of cultivation. The analysis of morphological and morphometric data helped to understand the germination process of the species studied. Further studies are required to test other formulations and supplements of culture media to accelerate seedling growth and production, contributing to the conservation of these species.

**Key words:** Orchidaceae, micro - orchids, *in vitro* germination, WPM culture medium.

## 1 INTRODUÇÃO

Pleurothallidinae Lindl. é uma Subtribo da família Orchidaceae, constituída de aproximadamente 5.100 espécies, conhecidas como micro-orquídeas (PRIDGEON *et al.*, 2005; KARREMANS, 2016). São encontradas nos neotrópicos: Costa Rica, Colômbia, Equador, Panamá, Venezuela, Peru e no Brasil, na Mata Atlântica, um dos biomas mais ameaçados de extinção do planeta, que teve sua área original reduzida em mais de 70% (MYERS *et al.*, 2000; PRIDGEON *et al.*, 2005; MENINI NETO e DOCHA NETO, 2009).

As sementes de orquídeas são muito pequenas, não apresentam endosperma e nem cotilédones como tecido de reserva. O embrião apresenta um número reduzido de células e é pouco desenvolvido, sendo protegido por tegumento que apresenta características distintas conforme a espécie (YEUNG, 2017). Apesar das sementes de orquídeas apresentarem muitas semelhanças, existe uma grande variabilidade quanto ao tamanho, forma, características das células da testa, das zonas de adesão e esculturas constituídas por material da parede celular e material cuticular (PRIDGEON *et al.*, 1999). Os embriões maduros de orquídeas apresentam proteínas de reserva, lipídios e raramente ocorre a presença de grãos de amido, sendo pouco conhecido como esses produtos de armazenamento afetam a germinação assimbiótica (YEUNG, 2017).

As cápsulas de orquídeas possuem muitas sementes, de tamanho reduzido e sem tecido de reserva (YEUNG, 2017) e apenas um número limitado germina naturalmente, sendo necessária uma associação com fungo micorrízico específico (GUPTA, 2016). Essa dificuldade de germinação na natureza atrapalha a continuidade das espécies, principalmente em áreas impactadas com perda de habitat e coleta predatória (TREMBLAY *et al.*, 2005). Com isso, a germinação assimbiótica de sementes é uma alternativa eficiente para propagação massal de orquídeas e micro-orquídeas. Existem poucos estudos de germinação assimbiótica de micro-orquídeas, os quais têm demonstrado baixas porcentagens de germinação e crescimento lento das plântulas (MILLNER *et al.*, 2008; ENDRES JÚNIOR *et al.*, 2014). Existem várias formulações de meio de cultura utilizadas para orquídeas, como por exemplo: KC (KNUDSON, 1946), MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e MS/2 (MS, com a concentração de sais reduzida pela metade). O meio de cultura

WPM (LLOYD e MCCOWN, 1980) se caracteriza por uma baixa concentração de sais e apesar de não ter sido testado para micro-orquídeas foi recomendado para algumas espécies de orquídeas, como: *Brasiliorchis picta* (SANTOS *et al.*, 2016) e *Hadrolaelia grandis* (VUDALA e RIBAS, 2017).

O conhecimento da morfologia e análise de dados morfométricos das sementes vem sendo uma contribuição importante para estudos taxonômicos, filogenéticos e fitogeográficos e também poderá contribuir para o entendimento do processo germinativo *in vitro* auxiliando na conservação de espécies de Pleurothallidinae.

O objetivo deste estudo foi analisar as características morfológicas e morfométricas das sementes para relacionar com a germinação assimbiótica e estabelecer um protocolo de produção de mudas de espécies da subtribo Pleurothallidinae.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL VEGETAL

Sementes maduras de 11 espécies da subtribo Pleurothallidinae foram coletadas de cápsulas maduras, iniciando a deiscência, de plantas cultivadas na casa de vegetação da Universidade Federal do Paraná – UFPR (Tabela 1; Figura 3A). As sementes foram utilizadas para estudos morfológicos, morfométricos e para a germinação assimbiótica.

Tabela 1– Espécies da subtribo Pleurothallidinae utilizadas como material vegetal.

Espécies	Número de coleta	Germinação <i>in vitro</i>
<i>Acianthera aphthosa</i>	KOENE, FM. 10	x
<i>Acianthera ochreatea</i>	KOENE, FM. 05	x
<i>Acianthera hatschbachii</i>	OLIVEIRA, LR. 19	-
<i>Acianthera prolifera</i>	KOENE, FM. 01	x
<i>Acianthera sonderiana</i>	KOENE, FM. 09	-
<i>Anathallis obovata</i>	SANTOS, M. 20	x
<i>Dryadella liliputiana</i>	IMIG, D. 381	x
<i>Dryadella zebrina</i>	IMIG, D. 405	-
<i>Pabstiella fusca</i>	KOENE, FM. 013	x
<i>Octomeria gracilis</i>	KOENE, FM. 014	x
<i>Stelis grandiflora</i>	IGNOWSKI, H. 11	x

## 2.2 ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS DAS SEMENTES

Dados quantitativos e qualitativos foram analisados em 30 sementes com auxílio de microscópio óptico e de varredura. Para as observações em microscopia eletrônica de varredura (MEV), as sementes foram aderidas em “stub” com fita adesiva de carbono dupla face e metalizadas com ouro. As seguintes características das sementes foram analisadas: cor, forma, ornamentação, formato da parede das células da testa, abertura micropilar e presença de depósito cuticular envolvendo o embrião.

As análises quantitativas foram realizadas com auxílio de microscópio de luz (Olympus BX41), sendo medidas as seguintes variáveis para as sementes e embriões: comprimento, largura, volume e porcentagem de espaço de ar entre a testa e o embrião. A fórmula utilizada para medir volume da semente foi:  $2 \cdot [(L/2)^2 \cdot (\frac{1}{2}C) \cdot (1.047)]$ , onde L= largura da semente, C= comprimento da semente e 1.047 é o valor de  $\pi/3$ . Para medir o volume do embrião foi utilizada a fórmula  $\frac{3}{4} \pi ab^2$  e para calcular a porcentagem de espaço de ar foi utilizada a fórmula:  $(\text{volume da semente} - \text{volume do embrião}) / \text{volume da semente} \times 100$  (ARDITTI *et al.*, 1979).

## 2.3 VIABILIDADE DAS SEMENTES

### 2.3.1 Teste do tetrazólio

A viabilidade das sementes foi avaliada pelo teste do tetrazólio. As sementes foram colocadas em solução de sacarose 10%, durante 24 horas em temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas três lavagens com água destilada e adicionada a solução de tetrazólio 1%, com as sementes mantidas em banho maria (40 °C) por 24 horas e no escuro. Após esse período, as sementes foram avaliadas quanto a coloração, seguindo a metodologia proposta por Hosomi *et al.* (2011). Somente as sementes viáveis, com embriões corados de vermelho foram utilizadas nos estudos morfométricos.



### 2.3.2 Germinação *in vitro*

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 1% (v/v), acrescida de 0,1% de Tween 20®, durante 15 minutos, em agitação. Em seguida, foram transferidas para um funil com papel filtro esterilizado, onde foram realizadas cinco lavagens com água destilada e autoclavada. Com auxílio de uma espátula foram semeadas em placas de Petri, (10 cm de diâmetro e 2 cm de altura) contendo 40 ml do meio de cultura “Woody Plant Medium” – WPM (LLOYD e McCOWN, 1980). Os meios foram suplementados com 5,6 g L<sup>-1</sup> de ágar Himedia® e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1 N, antes de adicionar o ágar. Os meios foram autoclavados à temperatura de 120 °C, durante 20 minutos.

As placas foram mantidas na sala de crescimento, com temperatura 26 ± 2°C/18 ± 2°C (dia/noite), fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de 40 µmol. m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>.

A avaliação da germinação foi realizada com aproximadamente 500 sementes por placa e três repetições. Os seguintes estádios de desenvolvimento foram avaliados de duas a dezesseis semanas: 1- semente com embrião clorofilado; 2- testa rompida/protocormo clorofilado (germinação); 3- protocormo com ápice e/ou rizóides; 4- protocormo com uma ou duas folhas; 5- protocormo com duas ou mais folhas e raiz (plântula). A avaliação da porcentagem de germinação foi realizada após 30, 60 e 90 dias de cultivo e o tempo médio em dias para atingir os estádios foi calculado durante 180 dias.

## 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Os dados da germinação assimbiótica foram submetidos ao teste de Bartlett, de Shapiro Wilk e análise de variância (ANOVA). As médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. O programa estatístico utilizado foi o PAST 3.3.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ANÁLISES MORFOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS DAS SEMENTES

As colorações das sementes avaliadas variaram de amarelo claro para *A. prolifera*, *D. lilitipuana* e *S. grandiflora* a tonalidades de marrom para maioria das espécies. As sementes apresentaram formas variadas: fusiforme (Figura 1A) filiforme (Figura 1B), elipsoide (Figura 1C) e clavada (Figuras 1D). Na maioria das sementes, a região das células da testa era mais alongada na porção mediana, enquanto que as células da extremidade das sementes eram de tamanhos irregulares. A extremidade chalazal das sementes é fechada e a extremidade micropilar aberta (Figura 1E), exceto para *D. zebrina* que é fechada (Tabela 2).

As células da testa da maioria das espécies estudadas eram oblongas, com exceção de *A. hatschbachii* que eram lineares e as de *A. prolifera* hexagonais (Figuras 1F-H).

A ornamentação das células da testa de algumas espécies apresentou forma de papilas ou verrugas e ausente para as espécies *A. prolifera*, *A. obovata* e *S. grandiflora* (Tabela 2).

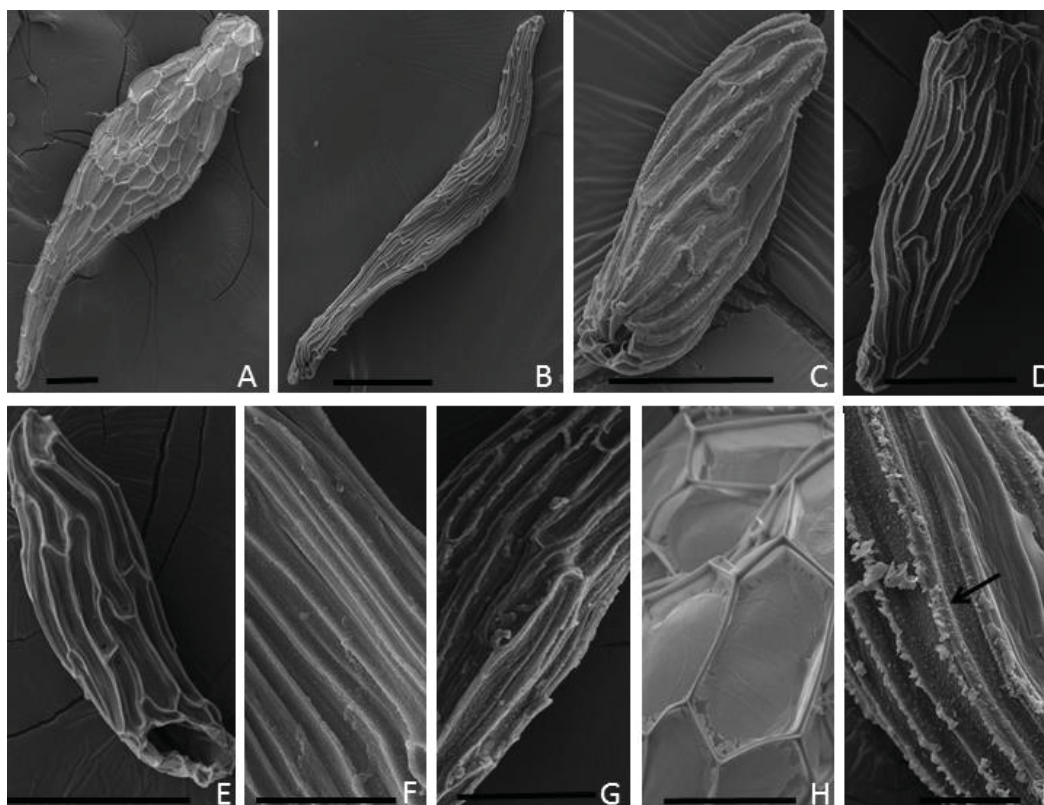


Figura 1. Sementes de espécies de Pleurothallidinae observadas em Microscopia Eletrônica de Varredura. A. semente fusiforme de *Acianthera prolifera*, B. semente filiforme de *Acianthera hatschbachii*, C. semente filiforme de *Dryadella liliputiana*; D. semente clavada de *Octomeria grandis*. E. extremidades das células da testa com células de tamanhos irregulares e região micropilar aberta de *Anathallis obovata*; F. testa da semente com células lisas de *Acianthera hatschbachii*; G. testa da semente com células oblongas de *Pabstiella fusca*; H. testa da semente com células hexagonais de *Acianthera prolifera*; I. Células da testa de *Dryadella zebrina* com ornamentação do tipo verruga (seta). Barra: 100µm

Tabela 2: Principais características morfológicas das sementes de espécies da subtribo Pleurothallidinae.

Espécies	Coloração	Formato da semente	Formato células da testa	Abertura micropilar	Ornamentação
<i>Acianthera apthosa</i>	amarelo claro	fusiforme	oblonga	sim	papilas
<i>Acianthera ochreatea</i>	marrom	elipsoide	oblonga	sim	verrugas
<i>Acianthera hatschbachii</i>	marrom	filiforme	lineares	sim	papilas
<i>Acianthera prolifera</i>	amarelo claro	fusiforme	hexagonal	sim	ausente
<i>Acianthera sonderiana</i>	marrom	clavada	oblonga	sim	verrugas
<i>Anathallis obovata</i>	amarelo claro	elipsoide	oblonga	sim	ausente
<i>Dryadella liliputiana</i>	marrom	elipsoide	oblonga	sim	verrugas
<i>Dryadella zebrina</i>	marrom	elipsoide	oblonga	não	verrugas
<i>Pabstiella fusca</i>	marrom	clavada	oblonga	sim	papilas
<i>Octomeria gracilis</i>	marrom	fusiforme	oblonga	sim	papilas
<i>Stelis grandiflora</i>	amarelo claro	clavada	oblonga	sim	ausente

As sementes apresentaram grande variação no tamanho (comprimento, largura e volume) (Tabela 3), bem como, no tamanho e número de células que constituem o embrião (Tabela 4). As sementes que apresentaram maior comprimento e número de células da testa foram as do gênero *Acianthera* sp., os quais foram significativamente superiores aos de *P. fusca* e de *S. grandiflora*. O maior volume foi obtido pela semente de *A. prolifera* ( $3,540 \text{ mm}^3 \times 10^{-3}$ ) e o menor em *P. fusca* ( $0,337 \text{ mm}^3 \times 10^{-3}$ ) (Tabela 3). O número de células da testa variou de 2 a 14 células no eixo de comprimento e 3 a 12 células no eixo de largura, sendo que o maior número foi visualizado em *A. prolifera* e *A. ochreatea* (Tabela 3).

Tabela 3 – Dados morfométricos das sementes de espécies de Pleurothalidinae.

Espécies	Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	Largura ( $\mu\text{m}$ )	Células da testa		Volume $\text{mm}^3 \times 10^{-3}$
			Comprimento-	Largura	
<i>Acianthera aphthosa</i>	513 $\pm$ 24,3	115 $\pm$ 21,2	9 – 12		1,401
<i>Acianthera hatschbachii</i>	401 $\pm$ 27,0	111 $\pm$ 31,1	6 – 12		1,293
<i>Acianthera ochreatea</i>	473 $\pm$ 24,6	139 $\pm$ 18,7	10 – 12		2,392
<i>Acianthera prolifera</i>	742 $\pm$ 119,4	135 $\pm$ 43,9	14 – 10		3,540
<i>Acianthera sonderiana</i>	307 $\pm$ 81,3	159 $\pm$ 18,5	3 – 6		2,032
<i>Anathallis obovata</i>	244 $\pm$ 31,1	109 $\pm$ 17,1	4 – 6		0,759
<i>Dryadella liliputiana</i>	265 $\pm$ 42,7	146 $\pm$ 20,1	2 – 5		1,479
<i>Octomeria gracilis</i>	247 $\pm$ 28,0	90 $\pm$ 16,5	5 – 6		0,524
<i>Pabstiella fusca</i>	187 $\pm$ 31,4	83 $\pm$ 7,0	4 – 3		0,337
<i>Stelis grandiflora</i>	195 $\pm$ 19,2	127 $\pm$ 21,2	2 – 5		0,823

Os valores representam as médias e desvios padrões.

Células da testa: medições no maior comprimento e maior largura da testa da semente.

Geralmente os embriões eram elipsoidais e localizados ao centro da semente. Os embriões também apresentaram bastante variação quanto ao tamanho; sendo que o de maior comprimento foi de *A. prolifera* e de maior largura e volume de *A. ochreatea*, enquanto o embrião de *P. fusca* também foi o menor em comprimento, largura e volume (Tabela 4).

Em relação à porcentagem de espaço de ar existente entre o tegumento da semente e o embrião, a semente que apresentou maior porcentagem foi a de *A. sonderiana* (87,83 %) e as menores de *O. gracilis* (61,21%) e *P. fusca* (56,14%) (Tabela 4).

Tabela 4 - Dados morfométricos de embriões de espécies da subtribo Pleurothalidinae e porcentagem de ar entre a testa e o embrião das sementes.

Espécies	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Volume mm <sup>3</sup> x 10 <sup>-3</sup>	% espaço de ar
<i>Acianthera aphtosa</i>	186±21,1	73± 14,9	0,5147	74,42
<i>Acianthera hatschbachii</i>	97±15,0	70± 15,0	0,2487	80,77
<i>Acianthera ochreatea</i>	175±23,5	99±14,8	0,8976	62,48
<i>Acianthera prolifera</i>	216±47,2	80±9,4	0,7235	79,56
<i>Acianthera sonderiana</i>	84± 7,0	75±18,8	0,2473	87,83
<i>Anathallis obovata</i>	76±17,5	69±6,7	0,1894	75,04
<i>Dryadella liliputiana</i>	90±12,4	80±9,0	0,3014	79,61
<i>Octomeria gracilis</i>	77±7,4	71±5,9	0,2031	61,21
<i>Pabstiella fusca</i>	69±8,2	64±7,2	0,1479	56,14
<i>Stelis grandiflora</i>	79±5,2	75±7,7	0,2326	71,75

Os valores representam as médias e desvios padrões.

### 3.1.1 Descrições anatômicas

As espécies que apresentaram testa fina ( $0,01 \pm 0,9 \mu\text{m}$ ) foram: *A. prolifera*, *A. obovata*, *O. gracilis* e *P. fusca*, nas outras a testa era espessa ( $0,03 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ). As células do pólo apical dos embriões de *A. aphtosa*, *A. ochreatea*, *A. prolifera* e *D. liliputiana* eram menores do que às do pólo basal, enquanto que das outras espécies, as células eram semelhante. A maioria das espécies estudadas não apresentaram suspensor, ocorrendo somente em *A. prolifera* e *D. liliputiana* (Tabela 5). As células da testa não estavam envoltas por cutícula, sendo visualizada somente circundando os embriões de *A. aphtosa* e *P. fusca*.



Tabela 5. Características anatômicas da testa de sementes, das células dos embriões, presença ou ausência do suspensor e de cutícula em espécies da subtribo Pleurothallidinae.

Espécies	Testa	Células do embrião	Suspensor	Cutícula
		pólo apical/basal		
<i>Acianthera aphthosa</i>	espessa	menores/maiores	não	sim/embrião
<i>Acianthera ochreatea</i>	espessa	menores/maiores	não	não
<i>Acianthera prolifera</i>	fina	menores/maiores	sim	não
<i>Acianthera sonderiana</i>	espessa	Iguais	não	não
<i>Anathallis obovata</i>	fina	Iguais	não	não
<i>Dryadella liliputiana</i>	espessa	menores/maiores	sim	não
<i>Octomeria gracilis</i>	fina	Iguais	não	não
<i>Pabstiella fusca</i>	fina	Iguais	não	sim/embrião
<i>Stelis grandiflora</i>	espessa	Iguais	não	não

### 3.2 GERMINAÇÃO IN VITRO

Após três a oito dias de semeadura, as sementes de todas as espécies de micro-orquídeas estudadas apresentaram embriões clorofilados (Figura 2B e 3A). As primeiras respostas de germinação, ou seja, sementes com testa rompida e protocormo clorofilado ocorreram para *A. prolifera* e *A. aphthosa*, após sete dias de semeadura e para as outras espécies entre nove e 13 dias (Tabela 6). De uma maneira geral, a maioria das sementes apresentou baixa porcentagem de germinação até 60 dias da semeadura, com exceção das de *A. prolifera* (76%). A avaliação realizada aos 90 dias confirmou maior resultado para *A. prolifera*, seguido de *A. ochreatea* e *O. gracilis*, com 92%, 86% e 77% de sementes germinadas, respectivamente. Das espécies estudadas apenas quatro atingiram o estágio de plântula: *A. prolifera*, *A. ochreatea*, *A. aphthosa* e *S. grandiflora*, com o tempo variando entre 90 e 120 dias (Tabela 6).

As sementes de *A. obovata* e *D. liliputiana* apresentaram comportamento semelhante no meio de cultura WPM, com porcentagens de germinação inferiores a 40% e os protocormos só formaram ápice, sem o desenvolvimento de folhas e da radícula, os quais foram visualizados entre 15 e 20 dias, não progredindo para os demais estádios na avaliação aos 180 dias. Da mesma forma, os protocormos de *O.*

*gracillis* também não desenvolveram folhas, apesar da porcentagem de germinação ter sido elevada (77%) aos 90 dias (Tabela 6). As sementes de *P. fusca* apresentaram a pior resposta de germinação, com apenas 4%, após 60 dias da semeadura, sendo que os protocormos não se desenvolveram no meio WPM e necrosaram.

Tabela 6. Porcentagem de germinação após 30, 60 e 90 dias da semeadura *in vitro*, em meio de cultura WPM e o tempo médio (dias) necessário para atingir os estádios de desenvolvimento dos protocormos de espécies de Pleurothallidinae.

Espécies	Germinação* (%)			Estádios de desenvolvimento** (dias)				
	30	60	90	I	II	III	IV	V
<i>Acianthera aphthosa</i>	7 b	38 c	41 cd	4	7	14	60	121
<i>Acianthera ochreatea</i>	35 b	53 b	86 a	4	9	14	60	119
<i>Acianthera prolifera</i>	39 a	76 a	92 a	3	7	10	35	90
<i>Anathallis obovata</i>	12 b	23 d	36 cd	3	10	15		
<i>Dryadella liliputiana</i>	4 b	15 e	38 cd	7	13	21		
<i>Octomeria gracillis</i>	4 b	21 d	77 b	5	11	21		
<i>Pabstiella fusca</i>	4 b	4 f		8	12			
<i>Stelis grandiflora</i>	7 b	15 e	51 c	8	11	21	95	127

\* Avaliação após 30, 60 e 90 dias da semeadura.

\*\* Avaliação realizada durante 180 dias após a inoculação. I: semente com embrião clorofilado; II: testa rompida (germinação); III: protocormo com ápice; IV: protocormo com uma ou duas folhas; V: protocormo com folhas e raiz (plântula).

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise das porcentagens obtidas em cada estágio de desenvolvimento dos protocormos confirmou as melhores respostas de germinação assimbiótica para *A. prolifera* e *A. ochreatea* (Figura 3). Após duas semanas de cultivo, as maiores porcentagens de sementes com embriões clorofilados ocorreram para as espécies *A. prolifera* (55%), *A. ochreatea* (52%) e *S. grandiflora* (49%) (Figura 3A). Nesse período de cultivo, as maiores porcentagens de germinação (testa rompida, com embrião clorofilado) ocorreram com *A. prolifera* (44%) e *A. ochreatea* (39%), sendo significativamente superiores às das outras espécies que não atingiram 10%.

Após quatro semanas da semeadura todas as espécies já apresentavam protocormos com ápice, com exceção de *P. fusca* (Figura 3B). Com seis a oito semanas de cultivo, *A. prolifera* apresentou a maior taxa de protocormos com ápice (27%) e foram visualizados protocormos com folhas apenas para essa espécie

(21%) (Figura 3D). O desenvolvimento de plântulas ocorreu a partir de 12 semanas, com maior frequência para *A. prolifera* (32%), seguido de *A. ochreata* (20%). Os protocormos de *A. aphtosa* e de *S. grandiflora* apresentaram um crescimento lento dos protocormos, formando plântulas com porcentagens inferiores a 10%, sendo necessário um período mais longo de avaliação (Figura 3E). O desenvolvimento dos protocormos de *A. ochreata* até a formação de plântulas (Figura 2) foi um pouco mais lento do que o de *A. prolifera* durante a germinação *in vitro*. No entanto, essa espécie apresentou plântulas vigorosas e foi possível realizar o transplântio e a aclimatização em casa de vegetação com 80% de sobrevivência em substrato comercial Forth®, composto de uma mistura de fibra de coco, casca de *Pinus* e carvão vegetal com vermiculita fina (1:1) após três meses.

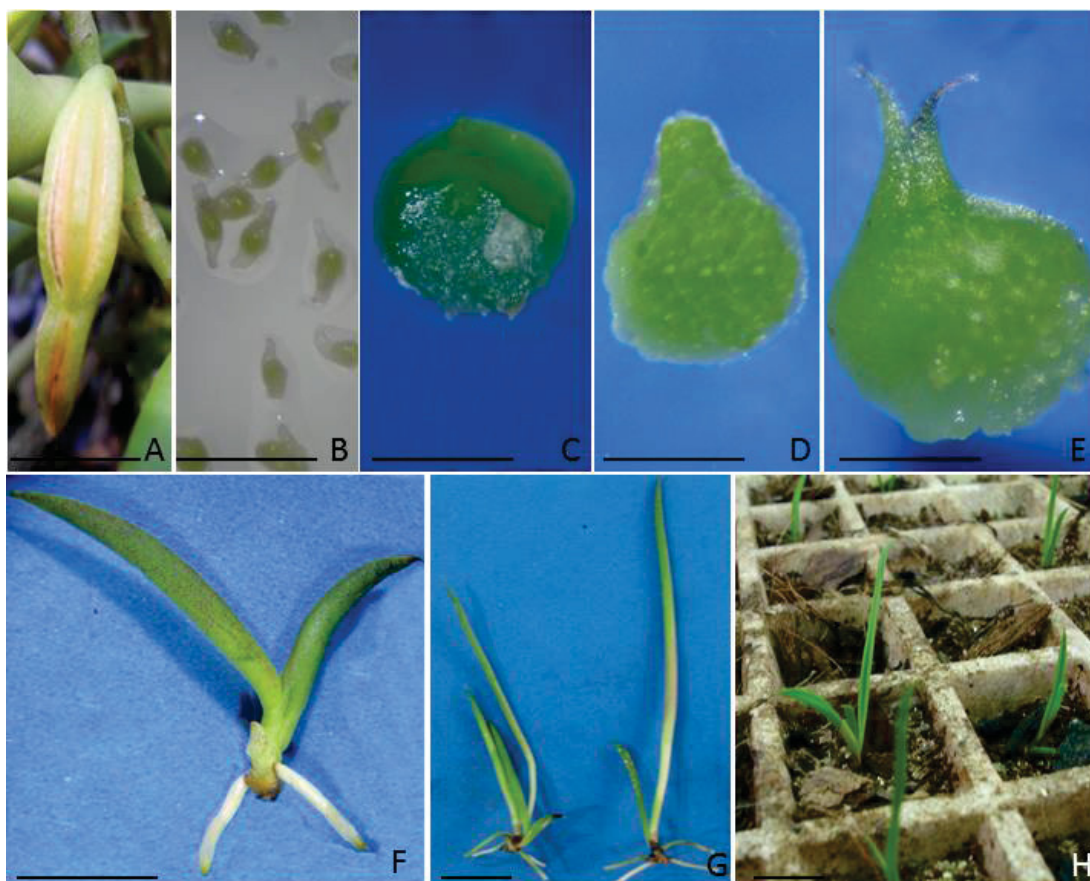


Figura 2. Germinação *in vitro* e desenvolvimento de protocormos de *Acianthera ochreate*. A. fruto em deiscência. Barra: 1 cm; B. sementes com embrião clorofilado; C. protocormo clorofilado; D. protocormo com ápice; E. protocormo com primórdios foliares; Barras B-E: 1 mm; F. plântula; G - H. plântulas alongadas e aclimatizadas em casa de vegetação. Barras F-H: 1 cm

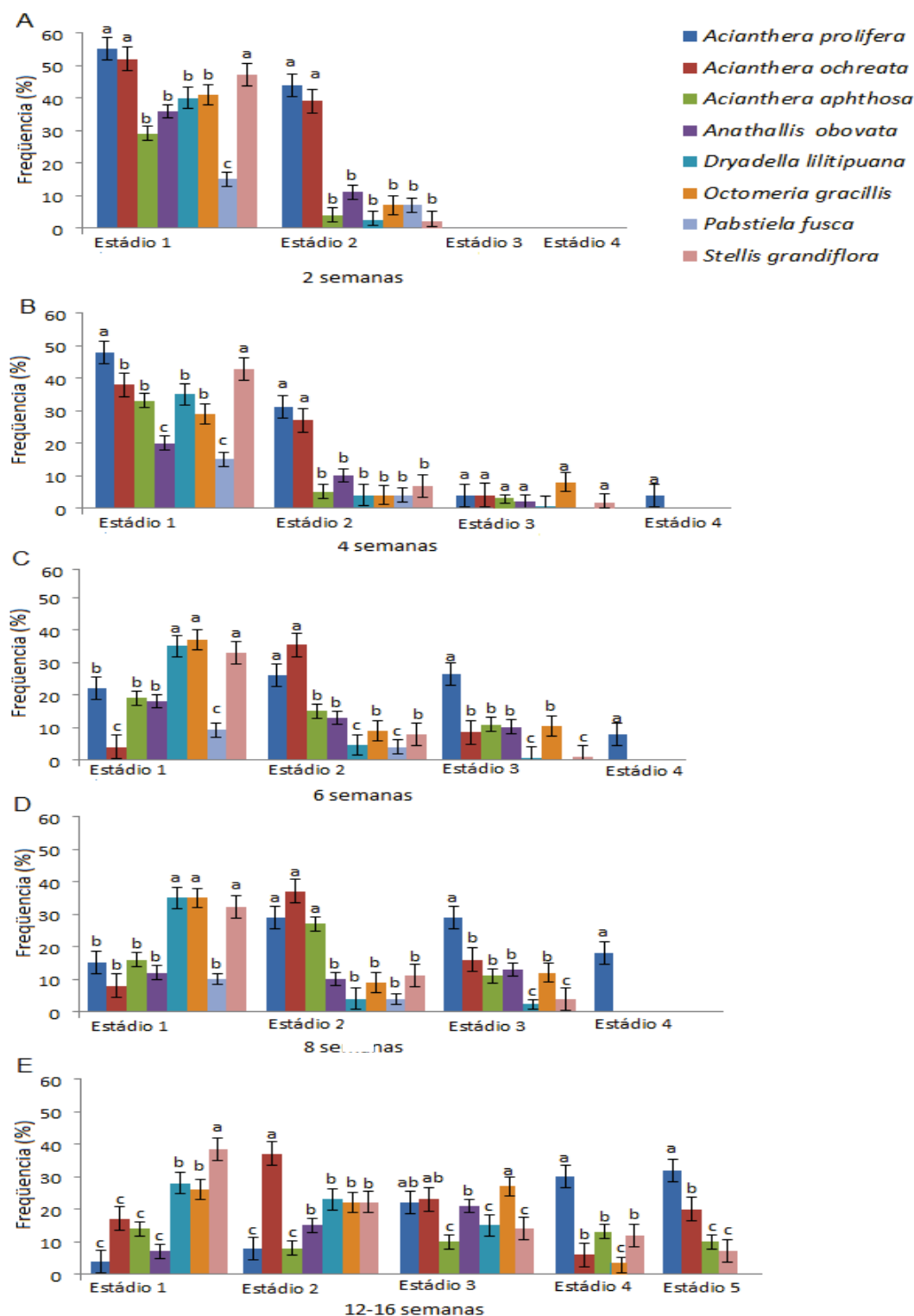


Figura 3. Frequência (%) dos estádios de desenvolvimento dos protocormos de espécies de Pleurothallidinae, cultivados *in vitro* por: A - duas, B - quatro, C - seis, D - oito, E - dezesseis semanas em meio de cultura WPM. estágio 1: semente com embrião clorofilado, 2: testa rompida (germinação), 3: protocormo com ápice, 4: protocormo com uma ou duas folhas, 5: protocormo com duas ou mais folhas e raiz (plântula). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade

## 4 DISCUSSÃO

As espécies da subtribo Pleurothallidinae apresentaram muita variação quanto às características morfológicas das sementes e embriões. A coloração das sementes variou de amarelo para tonalidades de marrom. Segundo Swamy *et al.* (2004), como as sementes de orquídeas são microscópicas é muito difícil de visualizar a sua cor, mas geralmente ocorrem variações de tonalidade de amarelo, marrom e branco. Também pode ocorrer variação na cor conforme a maturidade das sementes, como por exemplo, para sementes maduras de *Angraecum spp.* a testa era marrom e menos translúcida, enquanto as imaturas, eram mais claras e incolores (KENDON *et al.*, 2017).

Quanto à forma das sementes observou-se: elipsoides, clavadas, fusiformes ou filiformes, que também foram relatadas para outras espécies de orquídeas (CHASE e PIPPEN, 1988; SWAMY *et al.*, 2004, GAMARRA *et al.*, 2007). A forma apresenta um significado evolutivo entre as sementes, onde as fusiformes são encontradas em sementes de orquídeas mais primitivas e a variação das outras formas em orquídeas epidendroides mais evoluídas (VIJ *et al.*, 1992). No presente estudo, a forma fusiforme foi observada em sementes de *A. aphtosa*, *A. prolifera* e *O. gracilis*, indicando que essas espécies são mais primitivas.

As células da testa de *A. obovata*, *A. prolifera* e *S. grandiflora* não apresentaram ornamentação, enquanto que para as outras espécies foram visualizadas papilas ou verrugas. A presença ou ausência de ornamentação é citada na literatura para delimitar gêneros de Orchidaceae (CHASE e PIPPEN, 1988).

Variações no tamanho das sementes e embriões ocorreram em diferentes gêneros estudados da subtribo Pleurothallidinae: *Acianthera* sp., *Anathallis* sp., *Dryadella* sp., *Octomeria* sp. e *Stelis* sp. As sementes e embriões que apresentaram maior tamanho (comprimento, largura, volume) foram as de *A. prolifera* e *A. ochreatea* e essas espécies que apresentaram maiores porcentagens de germinação assimbiótica. Resultado semelhante foi obtido por Tsutsumi *et al.* (2007), em que os embriões maiores de *Lipares fujisanensis* apresentaram mais rápida capacidade germinativa do que os menores.

Na família Orchidaceae, têm espécies que apresentam suspensor e outras não. Nesse estudo, foi visualizado suspensor somente nas sementes de *A. prolifera*



e *D. liliputiana*. O suspensor desempenha um papel importante durante o desenvolvimento embrionário, facilitando o movimento de nutrientes dos tecidos maternos para o embrião (YEUNG, 2017). Essa estrutura pode ter facilitado à germinação de sementes de *A. prolifera*, uma vez que a resposta germinativa de *D. liliputiana* foi inferior. Outra diferença foi que a testa da semente de *D. liliputiana* era mais espessa e as sementes menores do que as de *A. prolifera*.

Outra característica que variou entre as espécies de micro-orquídeas foi a porcentagem de espaço de ar entre o tegumento da semente e o embrião; a maior porcentagem obtida foi para *A. sonderiana* (87,83%) e as menores para *O. gracilis* (61,21%) e *P. fusca* (56,14%). Resultados semelhantes foram obtidos por Swamy *et al.* (2004), em que as maiores porcentagens variaram entre 86,29% para *Cymbidium bicolor* e 47,39% para *Coleogyne breviscapa*. As sementes com maiores porcentagens de espaço de ar são mais leves e podem aumentar a flutuabilidade, auxiliando na dispersão pelo vento por grandes áreas geográficas (SWAMY *et al.*, 2004 e AYBEKE, 2014).

Em embriões de orquídeas pode ocorrer a existência de uma polaridade estrutural, sendo visualizado um gradiente de tamanho de células, com menores localizadas no ápice e maiores na base do embrião (YEUNG, 2017). Nesse estudo apenas quatro espécies apresentaram diferenças entre os pólos do embrião, sendo que as duas primeiras apresentaram as melhores respostas de germinação: *A. prolifera* (92%), *A. ochreatea* (86%), *A. aphtosa* (41%) e *D. liliputiana* (38%). Segundo Yeung (2017), as células do pólo apical do embrião irão formar uma zona meristemática e as basais servem para abrigar o simbionte após a germinação das sementes. Resultado semelhante foi observado para *Phalaenopsis amabilis*, que também apresentou essas diferenças nos pólos do embrião e germinaram mais facilmente (LEE *et al.*, 2008). Entretanto, para *Calypso bulbosa*, não foi observada diferença entre os pólos, sendo considerada uma espécie difícil de germinar (YEUNG e LAW, 1992). Para embriões de espécies sem diferenças de tamanho nos pólos das células, é necessário um maior crescimento e desenvolvimento do embrião propriamente dito. Na natureza estes requisitos podem ser fornecidos pelas micorrizas (YEUNG e LAW, 1992).

Foi observada presença de cutícula envolvendo o embrião em apenas duas espécies: *A. aphtosa* e *P. fusca*. Segundo Aybeke (2014), a formação de cutícula

pode assegurar retenção de umidade pelas células do embrião, aumentando a sua viabilidade, sendo visualizada também no embrião de *Himantoglossum robertianum*.

Os resultados de germinação assimbiótica indicaram melhores respostas para *A. prolifera* (92%), *A. ochreatea* (86%) e *O. gracilis* (77%), após 90 dias de semeadura em meio de cultura WPM. As duas primeiras espécies continham sementes e embriões maiores, com polaridade estrutural e para ambas foram obtidas plântulas após 90 a 120 dias de cultivo. No entanto, para *O. gracilis*, apesar da elevada porcentagem de germinação, não foi visualizado o desenvolvimento de folhas e não atingiram o estágio de plântula. Da mesma forma, outras espécies como *D. liliputiana* e *A. obovata*, apresentaram 38% e 36% de germinação, após 90 dias da semeadura e também os protocormos não formaram plântulas após 180 dias de cultivo. Além das características morfológicas e morfométricas que variaram bastante entre as espécies estudadas é provável que o meio de cultura WPM não tenha sido eficiente para todas as espécies. Segundo Suzuki *et al.* (2012), a composição do meio de cultura é importante para o sucesso da germinação de sementes de orquídeas e os resultados variam significativamente de uma espécie para outra. A determinação da composição nutricional mais adequada facilita a produção de um grande número de plantas e contribui para conservação de espécies ameaçadas de extinção (SUZUKI *et al.*, 2012).

A espécie que apresentou o pior resultado de germinação (4%) foi *P. fusca*, sendo que os protocormos clorofilados necrosaram após 30 dias de cultivo. Essa espécie continha as menores sementes e embriões, nos quais não foi observada polaridade estrutural o que pode ter dificultado a germinação *in vitro*. Além da possibilidade da formulação do meio também não ter sido apropriada para essa espécie, o tratamento de desinfestação com hipoclorito de sódio pode ter sido muito forte, uma vez que as sementes apresentavam testa fina e pode ter causado danos nos embriões. Outro fator a ser considerado é que algumas micro-orquídeas demonstraram desenvolvimento lento dos protocormos, como por exemplo, para *Anathallis adenochila* que foi necessário 12 meses para obtenção de plântulas (> 0,5 cm de altura) (ENDRES JÚNIOR *et al.*, 2014). Baixa porcentagem de germinação também foi relatada para outra espécie da subtribo Pleurothallidinae: *Restrepia brachypus*, que variou de 7,96% em meio MS a 53,05% em meio Western (W) (MILLNER *et al.*, 2008).

Esse estudo demonstrou grande variação morfológica, morfométrica e de respostas de germinação assimbiótica das espécies estudadas. A germinação foi assincrônica e é necessário testar outras formulações de meios de cultura para acelerar a produção de plântulas, realizar subcultivos na etapa de semeadura, para que não haja esgotamento de componentes dos meios e fazer avaliações por períodos mais longos, pois algumas espécies demonstraram crescimento muito lento.

## 5 CONCLUSÃO

Os estudos morfológicos e morfométricos das sementes de Pleurothallidinae contribuíram para o entendimento do processo germinativo de oito espécies da subtribo. A germinação assimbiótica e o desenvolvimento dos estádios dos protocormos até formação de plântulas em meio de cultura WPM foi eficiente para *A. prolifera* e *A. ochreatea*. A germinação das micro-orquídeas foi assincrônica e o meio de cultura WPM não pode ser recomendado para todas as espécies. Os protocormos de *A. obovata*, *D. liliputiana* e de *O. gracillis* apresentaram desenvolvimento lento, atingindo só a formação do ápice, enquanto para *S. grandiflora* e *A. aphtosa* ocorreu baixa frequência de formação de plântulas. Com isso, recomenda-se avaliações da germinação assimbiótica das espécies de micro-orquídeas por períodos superiores a 180 dias e testar outros meios de cultura para acelerar a produção de mudas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDITTI, J.; MICHAUD, J. D.; HEALEY, P. L. Morphometry of orchid seeds. *I. Paphiopedilum* and native California and related species of *Cypripedium*. **American Journal of Botany**, v. 66, p. 1128-1137, 1979.
- AYBEKE, M. Morphological and histochemical investigations on *Himantoglossum robertianum* (Loisel.) P. Delforge (Orchidaceae) seeds. **Plant systematics and evolution**, v. 300, n. 1, p. 91-97, 2014.
- CHASE, M W.; PIPPEN, J. S. Seed morphology in the Oncidiinae and related subtribes (Orchidaceae). **Systematic Botany**, v. 13, p. 313-323, 1988.
- ENDRES JUNIOR, D.; SASAMORI, M. H.; DROSTE, A. In vitro propagation of *Anathallis adenochilla* (Loefgr.) F. Barros (Orchidaceae), a species endemic to southern and southeastern Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 28, n. 4, p. 489-494, 2014.
- GAMARRA, R.; DORDA, E.; SCRUGLI, A.; GALAN, P.; ORTUNEZ, E. Seed micromorphology in the genus *Neotinea* Rchb. f.(Orchidaceae, Orchidinae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 153, n. 2, p. 133-140, 2007.
- GUPTA, A. Studies on *Malaxis acuminata* d. don (= *Microstylis wallichii* lindl.) a medicinally important orchid. **Journal of Global Research Computer Science and Technology**, v. 4, p. 1-11, 2016.
- HOSOMI, S. T; SANTOS, R. B; CUSTÓDIO, C. C; SEATON, P. T; MARKS, T. R; MACHADO NETO, N. B. Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. **Seed Science and Technology**, v. 39, n. 1, p. 178-189, 2011.
- KARREMANS, A. P. Genera Pleurothallidinarum: an updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae. **Lankesteriana**, v.16, n.2, p. 219 - 241, 2016.
- KENDON, J. P.; RAJAOVELONA, L.; SANDFORD, H.; FANG, R.; BELL, J.; SARASAN, V. Collecting near mature and immature orchid seeds for ex situ conservation: 'in vitro collecting' as a case study. **Botanical Studies**, v. 58, p. 1-14, 2017.
- KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American. Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.
- LEE, Y.I.; YEUNG, E.C.; LEE N.; CHUNG, M.C. Embryology of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa*: embryo development. **Botanical Studies**, v. 49, p.139–146, 2008.
- LLOYD, G.; McCOWN, B. H. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society**, v. 30, p.421-427, 1980.

MENINI NETO, L.; DOCHA NETO, A. Redescoberta e tipificação de *Octomeria leptophylla* Barb. Rodr. (Orchidaceae), micro-orquídea endêmica de Minas Gerais, Brasil. **Rodriguesia**, v. 60, n. 2, p. 461-465, 2009.

MILLNER, H. J.; OBENG, A.; MCCREA, A. R.; BALDWIN, T. C. Axenic seed germination and in vitro seedling development of *Restrepia brachypus* (Orchidaceae). **The Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 135, n. 4, p. 497-505, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

PRIDGEON, A.M.; BLANCO, M.; GOMES, R.S.; GRAYER, R.; HERMANS, J.; STENZEL, H.; VEITH, N.C. Subtribe Pleurothallidinae. In: PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M.W.; RASMUSSEN, F. N. (eds.). **Genera Orchidacearum**. New York: Oxford University Press, 2005. p. 319-422.

PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P.J.; CHASE, M.W.; RASMUSSEN, F.N. **Genera Orchidacearum**. Oxford: University Press, 1999.

SANTOS, S.A.; SMIDT, E.C.; PADIAL, A.A.; RIBAS, L.L.F. Asymbiotic seed germination and in vitro propagation of *Brasiliorchis picta*. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, p.134-144, 2016.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. M. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. **In Vitro Cellular e Development Biology - Plant**, v. 48, n.5, p. 500-511, 2012.

SWAMY, K. K.; KUMAR, H. K.; RAMAKRISHNA, T. M.; RAMASWAMY, S. N.. Studies on seed morphometry of epiphytic orchids from Western Ghats of Karnataka. **Taiwania-Taipei**, v. 49, p. 124-140, 2004.

TREMBLAY R.L.; ACKERMAN, J.D.; ZIMMERMAN J.K.; CALVO R.N. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. **Biological Journal of the Linnean Society of London**, v. 84, n.1, p. 1-54, 2005.

TSUTSUMI, C.; YUKAWA, T.; LEE, N. S.; LEE, C. S.; KATO, M. Phylogeny and comparative seed morphology of epiphytic and terrestrial species of *Liparis* (Orchidaceae) in Japan. **Journal of Plant Research**, v. 120, n. 3, p. 405-412, 2007.

VIJ, S. P.; PATHAK, P.; KAUR, P.; SHARMA, M. Somatic/artificial seeds in orchids. **Orchid News**, v. 8, n. 9, p. 12-13, 1992.

VUDALA, S. M.; RIBAS, L. L. F. Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae). **South African Journal of Botany**, v.108, p.1-7, 2017.

YEUNG, E. C.; LAW, S. K. Embryology of *Calypso bulbosa*. II. Embryo development. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, n. 3, p. 461-468, 1992.

YEUNG, E. C. A perspective on orchid seed and protocorm development. **Botanical Studies**, v. 58, p.1-14, 2017.



## CAPÍTULO II

### **Germinação assimbiótica de sementes e desenvolvimento de plântulas de *Acianthera prolifera* (Orchidaceae)**

(Artigo submetido à South African Journal of Botany)

#### **Resumo**

*Acianthera prolifera* é uma micro-orquídea rupícula da subtribo Pleurothallidinae, que apresenta sementes pequenas e sem endosperma, dificultando a germinação na natureza. O efeito do meio de cultura, de concentrações de sacarose e de carvão ativado foi avaliado no desenvolvimento de protocormos e de plântulas de *Acianthera prolifera* para estabelecer um protocolo de produção de mudas. Os meios de cultura: Murashige & Skoog (MS), MS, com a concentração de sais reduzida pela metade (MS/2), Knudson (KC) e “Woody Plant Medium” (WPM) foram testados para a germinação assimbiótica e desenvolvimento de plântulas durante 16 semanas. O meio MS/2 foi mais eficiente no início da germinação e o WPM o mais adequado para formação das plântulas. Os meios suplementados com sacarose estimularam o crescimento das plântulas após subcultivo dos explantes por 12 semanas para os mesmos meios, sendo que para a formulação WPM, deve-se adicionar 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose no meio MS/2. O alongamento de protocormos e plântulas ocorreram com maior eficiência em meio de cultura WPM contendo 1 g L<sup>-1</sup> de carvão de ativado, quando comparado com adição de sacarose. Foram feitas caracterizações anatômicas da semente e dos protocormos até a formação de plântula. As mudas foram aclimatizadas com sucesso (95%) com a mistura comercial Forth®, constituída de fibra de coco, casca de *Pinus* e carvão vegetal combinada com vermiculita (1:1) após 12 semanas de cultivo em casa de vegetação.

**Palavras-chave:** Pleurothallidinae, micro-orquídea, meios de cultura, carvão ativado, sacarose.

## Abstract

*Acianthera prolifera* is a micro-orchid of the subtribe Pleurothallidinae. Its seeds are small and without endosperm, making germination difficult in nature. The effect of the culture medium and of the addition of sucrose and the activated charcoal on in vitro germination and protocorms development of *Acianthera prolifera* was analysed in order to establish a protocol for the seedlings propagation and ensure their conservation. Murashige & Skoog (MS), MS with half the salt concentration (MS/2), Knudson C (KC), and "Woody Plant Medium" (WPM) culture media were tested for asymbiotic seed germination and plantlet development for 16 weeks. MS/2 was more efficient in the beginning of germination and WPM was more suitable for plantlet formation. Protocorms and plantlets developed more efficiently in WPM containing 1 g L<sup>-1</sup> activated charcoal. Culture media supplemented with sucrose promoted plantlet growth after a 12-week subculture and the recommended concentration of sucrose was 60 g L<sup>-1</sup> for WPM, and 15 g L<sup>-1</sup> for MS/2. Seed and protocorm anatomy was characterized until plantlet formation. The seedlings were successfully acclimatized (95%) in a commercial mixture of pine bark, coconut fibre, and activated charcoal combined with vermiculite (1:1) after 12 weeks of culture in a greenhouse.

**KeyWords:** Pleurothallidinae; micro-orchid; culture medium; activated charcoal; sucrose.

## 1. Introdução

*Acianthera prolifera* (Herb. ex Lind.) Pridgeon & M. W. Chase é uma micro-orquídea rupícula pertencente à subfamília Epidendreae e à subtribo Pleurothallidinae (Pridgeon et al., 2005). Ocorre em áreas de campos de altitude, inseridas na Mata Atlântica que é considerada um dos biomas mais ameaçados do mundo (Myers et al., 2000), podendo ocorrer também sobre afloramentos rochosos ou serapilheiras (Barros et al., 2015).

As orquídeas apresentam sementes muito pequenas e são desprovidas de endosperma, dificultando a sua propagação na natureza (Arditti e Ernst, 1993). Para que a germinação ocorra no ambiente natural, as sementes precisam encontrar um fungo micorrízico específico (Seaton et al., 2013). Isso tem limitado o sucesso da continuidade das populações, especialmente nas áreas afetadas pela perda de habitats devido à fragmentação das florestas (Tremblay et al., 2004). Essa dificuldade da propagação por sementes na natureza, aliada a ameaça de extinção de muitas espécies de orquídeas, tem demonstrado cada vez mais a necessidade de desenvolver estratégias de conservação *ex situ* (Swarts e Dixon, 2009).

A técnica de semeadura *in vitro* de orquídeas torna possível o aproveitamento máximo de sementes, mas para a germinação ocorrer com eficiência é necessário compreender as exigências fisiológicas das espécies a serem propagadas, sendo necessário um meio de cultura adequado (Arditti e Ernst, 1993; Yeung, 2017). Várias formulações de meios de cultura, como KC (Knudson, 1946), MS (Murashige e Skoog, 1962) e MS/2 (MS, com a concentração de sais reduzida pela metade) vêm sendo utilizadas com sucesso para germinação de várias espécies de orquídeas. No entanto, existem poucos estudos com germinação *in vitro* de micro-orquídeas, os quais têm apresentado baixas porcentagens de germinação e crescimento lento de protocormos, como relatado para *Anathallis adenochila* (Endres Junior et al., 2014) e *Restrepia brachypus* (Millner et al., 2008). Uma alternativa para acelerar o desenvolvimento de plântulas é testar o efeito do carvão ativado e de diferentes concentrações de sacarose. O carvão ativado é comumente usado nos meios de cultura podendo promover ou inibir o crescimento *in vitro*, dependendo da espécie e exerce um papel crítico na micropropagação e germinação de sementes de orquídeas (Pan e van Staden, 1998; Thomas, 2008).

Além da formulação salina é necessária a adição de uma fonte de carbono nos meios de cultura de células e tecidos vegetais devido à heterotrofia das células cultivadas. Diferentes carboidratos podem apresentar efeitos distintos na morfogênese, sendo necessário avaliar a sua influência e a concentração ideal para cada espécie. A sacarose tem sido o carboidrato mais utilizado na maioria dos estudos de indução, desenvolvimento de brotos e indução de raízes *in vitro* (Yaseen et al., 2012).

O objetivo desse estudo foi estabelecer um protocolo de germinação assimbiótica de *A. prolifera* para a produção de mudas e descrever a morfologia da semente e dos estádios de desenvolvimento dos protocormos até a formação de plântulas para uma melhor compreensão do processo germinativo da espécie.

## **2. Material e métodos**

### *2.1 Material vegetal*

Seis cápsulas maduras de *A. prolifera*, iniciando a deiscência foram coletadas, após quatro meses da polinização natural e manual de flores (Figura 1A).

### *2.2 Teste de viabilidade do tetrazólio (TZ)*

A viabilidade das sementes foi verificada pelo método de coloração com cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio. Amostras de aproximadamente 5 mg de sementes permaneceram durante 24 horas em solução de sacarose 10%, em temperatura ambiente e depois foram transferidas para solução de tetrazólio 1%, durante 24 horas, em banho-maria, com temperatura constante de 40°C e na ausência de luz, conforme a metodologia descrita por Hosomi et al. (2011). A avaliação da viabilidade das sementes foi realizada com 100 sementes e cinco repetições. As sementes foram classificadas em viáveis as que apresentaram coloração vermelha carmim e inviáveis as com embriões incolores ou as desprovidas de embrião.

### 2.3 Germinação *in vitro*

Em câmara de fluxo laminar, cápsulas maduras foram cortadas longitudinalmente e as sementes desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) 1% (v/v), acrescida de 0,1% de Tween 20®, durante 15 minutos, em agitação. Em seguida, foram transferidas para um funil revestido com papel filtro esterilizado, onde foram realizadas quatro lavagens com água destilada autoclavada. Após a secagem das sementes, com auxílio de uma espátula foram semeadas em placas de Petri, contendo 40 ml dos meios de cultura: KC, MS, MS/2 (MS, com a concentração de sais reduzida pela metade) e WPM (Lloyd e McCown, 1980) (Anexo 1). Todos os meios foram suplementados com 5,6 g L<sup>-1</sup> de ágar Himedia® e 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 com NaOH ou HCl 0,1N, antes da adição do ágar. Os meios foram autoclavados à temperatura de 120 °C, durante 20 minutos.

Para a avaliação da germinação foram marcados cinco campos com 100 sementes por placa e cinco repetições. As avaliações dos estádios de desenvolvimento de protocormos até a formação de plântulas (Tabela 1) foram realizadas a cada duas semanas e a avaliação final após 16 semanas. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado pela fórmula proposta por Maguire (1962) e simplificada por Hosomi et al. (2011):  $IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \frac{G_3}{N_3} + \frac{G_4}{N_4}$  onde  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $G_3$  e  $G_4$  representam a quantidade de sementes germinadas em cada período e  $N_1$ ,  $N_2$ ,  $N_3$  e  $N_4$ , o intervalo de tempo em cada período de contagem. As avaliações de IVG foram feitas após duas, quatro, seis, oito e doze semanas.

### 2.4 Alongamento e desenvolvimento da parte aérea do caule e raízes

As plântulas com aproximadamente 0,5 cm de altura, duas folhas, obtidas da germinação *in vitro*, após 16 semanas de cultivo foram utilizadas como explantes. As suas radículas foram cortadas e os explantes foram inoculados em meio de cultura WPM ou MS/2, acrescido de: 0, 1, 2 e 4 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado ou de: 0, 15, 30 e 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Foram colocadas seis plântulas por frasco e nove repetições, totalizando 54 por tratamento.

Os explantes do experimento com carvão ativado foram cultivados nos meios e avaliados após 12 semanas e os do experimento com sacarose, após 12 semanas

foram subcultivados para os mesmos meios por mais 12 semanas. Foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de enraizamento, número médio de raízes, comprimento médio das raízes, comprimento médio da parte aérea e massa fresca das plantas.

### *2.5 Transplantio e aclimatização das mudas*

Após 12 semanas de alongamento em meio contendo carvão ativado, as plantas com aproximadamente 1,5 cm de altura, contendo três folhas, foram retiradas dos frascos, as raízes lavadas e transplantadas em bandejas com células de 1,5 x 1,5 cm, contendo os seguintes substratos isolados: 1- vermiculita fina Eucatex®, 2- mistura comercial Forth® constituída de fibra de coco, casca de *Pinus* e carvão vegetal, e a combinação de 1 e 2 na proporção de 1:1. Cada tratamento foi constituído de 10 plantas e seis repetições. As mudas foram aclimatizadas em casa de vegetação coberta, com fotoperíodo de 16 horas, em sistema de nebulização (a cada seis horas durante três minutos) por sete dias e posteriormente foi realizada irrigação manual a cada três dias. Após doze semanas foi avaliada a porcentagem de sobrevivência das mudas.

### *2.6 Condições de cultivo*

Para a germinação *in vitro* foram utilizadas placas de Petri (10 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura) contendo 40 ml de meio de cultura. Para a etapa de alongamento e desenvolvimento de raízes, os explantes foram colocados em frascos de capacidade de 100 ml (6,5 cm de diâmetro e 8 cm de altura) contendo 40 ml de meio de cultura. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, sob temperatura de  $25 \pm 2$  °C/ $18 \pm 2$  °C (dia/noite), fotoperíodo de 16 horas e luminosidade de  $40 \mu\text{mol.m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

### *2.7 Análises histológicas*

Sementes contendo embrião e os estádios de desenvolvimento dos protocormos até plântulas foram fixados em FAA 50 (Johansen, 1940). O material foi desidratado em série etanólica e emblocado em historesina (Leica historesin®),



seguindo as instruções do fabricante. Secções de 5 µm de espessura foram realizadas, com o auxílio do micrótomo rotativo. As lâminas foram coradas com azul de toluidina (O'Brien *et al.*, 1965). Teste histoquímico com Lugol (Berlyn e Miksche, 1976) foi realizado para detectar amido nas sementes e protocormos. As secções foram analisadas e registradas em microscópio de luz Olympus BX41, acoplado a uma câmera digital Olympus DC030.

## 2.8 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os dados obtidos da germinação, alongamento e aclimatização de plântulas foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk (S.W.). Os dados de germinação *in vitro* e de aclimatização de plantas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 1% de significância. Os dados do alongamento de plântulas que não apresentaram normalidade foram transformados em  $\log_{10}$ , sendo então submetidos a um teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com correções de Bonferroni ao nível de 1% de significância. O programa estatístico utilizado foi o PAST 3.3.

## 3. Resultados

### 3.1 Teste de viabilidade e germinação *in vitro*

O resultado do teste TZ indicou 76% de sementes viáveis, 23% de sementes inviáveis e 1% sem embrião (Figura 1B).

As primeiras respostas de germinação assimbiótica foram obtidas após duas semanas da semeadura, observando-se a presença de embriões clorofilados e intumescidos (Figura 1C) e de sementes com a testa rompida, ou seja, germinadas (Figura 1D). Na sequência ocorreu formação do ápice (Figura 1E) e ocasionalmente rizóides na superfície basal dos protocormos. Após seis semanas de cultivo ocorreu o desenvolvimento de duas folhas a partir de primórdios foliares (Figura 1F), seguido da emissão da radícula, caracterizando o estágio de plântula (Figura 1G).

O efeito dos diferentes meios de cultura na germinação assimbiótica e no desenvolvimento dos protocormos de *A. prolifera* foi avaliado por um período de duas a dezesseis semanas). Os resultados mostraram que o tipo de meio basal influenciou a germinação de sementes e o desenvolvimento dos protocormos até a formação de plântulas. As primeiras respostas de germinação (embrião clorofilado e testa rompida) foram observadas com maior frequência no meio de cultura MS/2 (Figuras 2A e 2B), após quatro semanas de cultivo. A partir da sexta semana, as porcentagens dos protocormos com ápices e rizóides dos meios MS/2 e WPM foram superiores às obtidas nos meios MS e KC (Figuras 2C-2D). As primeiras radículas foram observadas a partir de 12 semanas nos meios MS, MS/2 e WPM (Figura 2E). Os explantes cultivados no meio WPM apresentaram um desenvolvimento inicial dos protocormos mais lento, quando comparado ao do meio MS/2, porém, na avaliação final demonstraram os melhores resultados para a formação de plântulas (40%).

Os resultados da germinação total de sementes indicaram 79% de sementes germinadas (testas rompidas) para as cultivadas em meio WPM, sendo significativamente superior ao de outros meios testados, após dezesseis semanas de cultivo (Tabela 2). A germinação de *A. prolifera* no meio KC não é recomendada, pois o desenvolvimento dos protocormos foi mais lento e com menor frequência (36%). Além disso, não houve formação de plântulas, com 45% dos protocormos necrosados após 16 semanas de cultivo.

A avaliação do índice de velocidade de germinação confirmou os resultados obtidos de porcentagem de germinação, com melhor resultado para as sementes cultivadas nos meios MS e MS/2 nas duas primeiras semanas de cultivo *in vitro* (Tabela 3). A partir da sexta semana, o IVG foi maior para as sementes cultivadas no meio WPM (Tabela 3). As sementes mantidas no meio KC apresentaram IVG inferior ao dos outros meios em todos os períodos avaliados, com exceção ao do período de 12 semanas, indicando uma resposta mais lenta e que não é indicado para *A. prolifera* (Tabela 3).

### *3.2 Alongamento e desenvolvimento da parte aérea do caule e raízes*

#### 3.2.1 Efeito do carvão ativado

Os explantes cultivados em meio de cultura WPM ou MS/2, acrescido de carvão ativado, independente da concentração (1, 2 ou 4 g L<sup>-1</sup>), apresentaram resultados superiores aos dos explantes mantidos nos meios sem carvão ativado para todas as variáveis analisadas (Figura 3). Observou-se a presença de exsudatos liberados pelos explantes nos meios sem carvão ativado e as plântulas eram menos vigorosas (Figura 1H). Além disso, o enraizamento foi de 80% para os explantes cultivados no meio sem carvão e 100% para os cultivados nas diferentes concentrações de carvão nos meios WPM e MS/2. Apesar de não haver diferenças significativas dos resultados obtidos com os explantes cultivados em meios com diferentes concentrações de carvão ativado, recomenda-se o uso do meio de cultura WPM, com a adição de 1 g L<sup>-1</sup>, por reduzir o custo do protocolo de produção de mudas e as plântulas serem mais vigorosas quando comparadas com as cultivadas no meio MS/2 (Figuras 1I e 1J).

#### 3.2.2 Efeito da sacarose

A adição de sacarose é necessária nos meios de cultura WPM e MS/2 e a melhor concentração para promover o crescimento das plântulas variou conforme a formulação. A presença de raízes ocorreu em 100% dos explantes cultivados no meio sem ou com diferentes concentrações de sacarose, tanto para o WPM, como para o MS/2. A formulação WPM deve ser suplementada com 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose, pois as plântulas cultivadas nesse meio apresentaram maior comprimento das raízes, da parte aérea do caule e massa fresca (Figuras 1K e 4A - 4D).

Os explantes cultivados no meio MS/2, acrescido de 15 g L<sup>-1</sup> de sacarose apresentaram resultados significativamente superiores quando comparados com os cultivados na ausência e nos meios contendo concentrações de 30 e 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose para as variáveis: comprimento de raízes e massa fresca (Figuras 1K e 4E-4H).

### 3.3 Transplântio e aclimatização das mudas

A sobrevivência das mudas foi de 100% para as plântulas transplantadas em todos os tratamentos após quatro semanas de aclimatização em casa de vegetação (Figura 1L). Após 12 semanas, as plantas cultivadas na mistura comercial Forth® de substratos: fibra de coco, casca de *Pinus*, fibra de coco, carvão vegetal, combinada com vermiculita apresentaram 95% de sobrevivência (Tabela 4).

### 3.4 Análises histológicas

A semente de *A. prolifera* é constituída de embrião indiferenciado, contendo de 8 a 10 células, apresentando suspensor com duas a quatro células, circundado pela testa formada por uma camada de células (Figura 5A). Não contém endosperma e cotilédone, apresentando espaço aéreo entre a testa e o embrião. O embrião não apresentou amido. O protocormo globular é formado por células parenquimáticas menores na região apical e maiores na região central e basal, compostas de amido e é revestido por epiderme unisseriada (Figura 5B). No pólo apical do protocormo, ocorreu a formação do ápice caulinar (Figura 5C) e posteriormente na base foram visualizados os rizóides unicelulares (Figuras 5D e 5E). Com o desenvolvimento do meristema caulinar, surge o primeiro primórdio foliar. Na epiderme abaxial das folhas foram visualizados estômatos e idioblastos com ráfides no mesofilo. Após o desenvolvimento de duas ou mais folhas, desenvolveu-se a radícula de origem endógena, constituindo o estágio de plântula (Figuras 5F a 5H). Foi observada a presença de amido nos estádios de protocormo até a formação de plântula.

## 4. Discussão

As sementes de *A. prolifera* apresentaram uma porcentagem elevada de sementes viáveis (76%) pelo teste TZ e os resultados foram confirmados pela germinação *in vitro* (72%, 74% e 79%) após dezesseis semanas de cultivo em meios de cultura MS, MS/2 e WPM, respectivamente. Estudos têm questionado o uso só do

teste TZ como indicador da germinabilidade das sementes, demonstrando a importância de comprovar os resultados com a germinação *in vitro*, como foi constatado por Johnson e Kane (2007) para *Vanda* sp., pois para alguns híbridos a viabilidade das sementes do TZ foi superior à da germinação *in vitro* e para outros foi semelhante. Segundo Lauzer *et al.*, (2007), essa discrepância poderia ser explicada pela exigência por nutrientes ou outros componentes do meio de cultura que estão ausentes ou não estão em concentração ótima. Isso foi constatado no presente estudo, quando as sementes foram cultivadas no meio KC, obtendo-se apenas 36 % de germinação.

A germinação de sementes de *A. prolifera* foi assincrônica e as respostas iniciais ocorreram com maior frequência e velocidade no meio de cultura MS/2, enquanto o desenvolvimento dos protocormos e formação de plântulas foram melhores no meio WPM. Segundo Kauth *et al.* (2008), nem sempre a formulação ideal para a germinação inicial é a mesma para o desenvolvimento de protocormos e formação de plântulas e isso foi constatado para *A. prolifera*. Um dos fatores mais importantes na determinação do melhor meio de cultura para cada espécie depende da concentração total de nitrogênio e da taxa amônio/nitrato (McCown e Sellmer, 1987). O meio de cultura MS é muito utilizado por apresentar alta concentração de sais, com elevada concentração de cálcio, potássio, fósforo que podem inibir ou estimular o crescimento, enquanto a formulação do WPM foi proposta para espécies lenhosas, que apresentavam sensibilidade a sais. O meio WPM apresenta concentrações de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  inferiores ao do MS/2, apesar da taxa amônio/nitrato e a concentração de potássio ser semelhante nas duas formulações. O nitrogênio tem um papel muito importante na germinação de sementes de orquídeas (Kauth *et al.*, 2008) e o fato de terem ocorrido melhores respostas iniciais de germinação de sementes no meio MS/2 pode ser explicado pela maior concentração total de nitrogênio (29,7 mM), quando comparada com a do meio WPM (14,5 mM). O meio MS/2 tem sido escolhido para semeadura *in vitro* de muitas espécies de orquídeas, como por exemplo, para *Alatiglossum fuscopetalum* (Ferreira *et al.* 2017). Resultados semelhantes ao do presente estudo foram obtidos com sementes de *H. grandis* (Vudala e Ribas, 2017) e de *Brasiliorchis picta* (Santos *et al.*, 2016), cultivadas em diferentes meios de cultura, sendo que a maior porcentagem de germinação, maior IVG e melhor desenvolvimento de plântulas também ocorreram no meio de cultura WPM. Para *H. grandis*, o meio MS também foi eficiente no início

da germinação de sementes, mas posteriormente ocorreu mortalidade que pode ter sido causada pela alta concentração de amônio e nitrato (Vudala e Ribas, 2017).

O meio de cultura KC, apesar de ser recomendado para muitas espécies de orquídeas, não foi eficiente para *A. prolifera* pela baixa porcentagem de germinação, elevada mortalidade e os protocormos não atingiram o estágio de plântula. O meio KC apresenta uma baixa concentração de potássio, quando comparado aos meios MS, MS/2 e WPM e não é acrescido de vitaminas, mio-inositol e glicina. Isso pode ter inibido a germinação e o desenvolvimento de plântulas de *A. prolifera* no meio KC, causando necrose dos protocormos, como também foi relatado para *H. grandis* (Vudala e Ribas, 2017).

Os explantes de *A. prolifera*, cultivados em meio de cultura sem carvão ativado, liberaram exsudatos nos meios inibindo o desenvolvimento das plântulas. A presença do carvão ativado nos meios de cultura WPM e MS/2 foi benéfica para acelerar o desenvolvimento das plântulas. Apesar dos protocormos cultivados nos meios com carvão não apresentarem diferença estatística entre as concentrações testadas (1, 2 e 4 g L<sup>-1</sup>) para todas variáveis avaliadas, recomenda-se a adição de 1 g L<sup>-1</sup> para reduzir o custo do protocolo de produção de mudas. Um dos efeitos benéficos do carvão ativado é de adsorver substâncias inibidoras liberadas pelo meio ou pelos explantes podendo promover o alongamento e enraizamento (Pan e van Staden, 1998) e isso foi constatado nesse estudo. A concentração ótima do carvão ativado tem variado entre as espécies, também sendo recomendada 1 g L<sup>-1</sup> para protocormos de *H. grandis* (Vudala e Ribas, 2017) e 3 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado para *Zygostates grandiflora* (Pacek-Bieniek et al., 2010) e *Brasiliidium forbesii* (Gomes et al., 2015).

A sacarose mostrou-se fundamental para o desenvolvimento das plântulas de *A. prolifera* e as melhores respostas foram obtidas quando o meio WPM foi suplementado com 60 g L<sup>-1</sup>, com plântulas mais vigorosas, quando comparadas com as cultivadas no meio MS/2, contendo 15 g L<sup>-1</sup>. Isto pode ser explicado pela diferença de concentração de sais presentes nos meios utilizados. O meio WPM, por apresentar uma composição mais diluída em nutrientes, necessita de uma fonte mais elevada de carboidrato que o meio MS/2. Endres Júnior et al. (2014) também obtiveram melhores resultados de sobrevivência e desenvolvimento dos protocormos da micro-orquídea *Anathallis adenochila*, em meio MS/2, suplementado com 30 e 60 g L<sup>-1</sup> de sacarose. Entretanto, para várias espécies de orquídeas, como híbridos



de *Dendrobium nobile* (Udomdee et al., 2013), concentrações elevadas de sacarose podem causar um estresse osmótico nas sementes e plântulas, inibindo a germinação e o crescimento. Essa resposta ocorreu para as sementes de *A. prolifera* cultivadas no meio MS/2, sendo que a concentração ótima foi 15 g L<sup>-1</sup>, ocorrendo uma inibição do desenvolvimento das plântulas em meio contendo 30 e 60 g L<sup>-1</sup>. Resposta semelhante foi obtida por Ferreira et al. (2017), recomendando a adição de 10 a 30 g L<sup>-1</sup> no meio MS/2 para estimular o crescimento de plântulas de *Alatiglossum fuscopetalum* e para as de *Cyripedium macranthos* em meio MS/4 contendo 10 g L<sup>-1</sup> (Huh et al., 2016). Sendo assim, a concentração ideal de sacarose tem variado conforme a formulação de meio de cultura e depende da espécie estudada.

O desenvolvimento dos protocormos cultivados nos meios WPM ou MS/2, acrescidos de diferentes concentrações de sacarose foi mais lento, quando comparado com o experimento contendo carvão ativado, pois foi necessário um novo subcultivo após 12 semanas para obtenção de plântulas com características morfológicas semelhantes às obtidas nos meios contendo carvão ativado. Com isso, para acelerar a produção de mudas de *A. prolifera* recomenda-se a adição de 1 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado no meio de cultura WPM com 30 g L<sup>-1</sup>.

A anatomia da semente de *A. prolifera* foi semelhante à descrita para outras espécies de orquídeas, circundada por uma camada de células, constituindo a testa, com embrião simples e indiferenciado, apresentando suspensor pouco desenvolvido (Kraus et al., 2006; Gallo et al., 2016). Nem todas as sementes de orquídeas apresentam suspensor e para algumas espécies de Laeliinae, ele era constituído de duas a três camadas de células (Gallo et al., 2016). Segundo Yeung (2017), a falta de endosperma pode ser a causa da formação de embriões muito pequenos e é provável que o papel do suspensor seja de absorver nutrientes auxiliando no desenvolvimento do embrião.

O protocormo globular, circundado pela epiderme é constituído por células menores no polo apical e maiores no polo basal, representando a existência de uma polaridade estrutural, descrita por Yeung (2017) e também para outras espécies, como: *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa* (Lee et al., 2008). As células do polo apical se dividem rapidamente formando o meristema apical, que segundo Yeung (2017), apresenta um importante papel no desenvolvimento da plântula. As células meristemáticas se dividiram intensamente formando primórdios foliares que

posteriormente se desenvolveram em folhas. Na porção basal dos protocormos foram observados rizóides unicelulares que atuam na absorção de nutrientes (Rasmussen et al., 1990). A presença de amido foi visualizada primeiramente no protocormo e nos outros estádios até a formação de plântulas. Poucos estudos relataram a importância de reservas nutritivas, como o amido e a sua influência na germinação *in vitro* (Yeung, 2017). Porém, o acúmulo de amido nas células dos embriões pode estar relacionado com a presença de açúcar presente nos meios de cultura (Alvarez e Sagawa, 1965). A raiz formada de *A. prolifera* é de origem endógena, como também foi descrito para *C. pileatum* (Kraus et al., 2006).

Na etapa de aclimatização das plântulas de *A. prolifera*, a mistura dos substratos: fibra de coco, casca de *Pinus*, carvão vegetal e vermiculita (1:1) foi mais adequada para o transplântio. A sobrevivência de mudas de *A. prolifera* pode ter relação com a porosidade desses substratos, ou seja, boa relação entre água e ar, permitindo melhor desenvolvimento do sistema radicial assim como ocorreu para outras espécies de orquídeas que utilizaram estes mesmos substratos isolados ou combinados (Assis et al., 2008; Vasudevan e Van Staden, 2010; Sasamori et al., 2015).

## 5. Conclusão

A germinação *in vitro*, o desenvolvimento de plântulas e a aclimatização em casa de vegetação foram realizadas com sucesso para *A. prolifera*. Recomenda-se o uso do meio WPM para a germinação e desenvolvimento dos protocormos e a adição de 1 g L<sup>-1</sup> de carvão ativado para acelerar o crescimento das plântulas. A mistura comercial Forth® de substratos fibra de coco, casca de *Pinus*, carvão vegetal e vermiculita (1:1) deve ser utilizada para o transplântio e aclimatização de mudas.

## 6. Referências bibliográficas

Alvarez, M.R., Sagawa, Y., 1965. A histochemical study of embryo development in *Vanda* (Orchidaceae). *Caryologia* 18, 251-261.

- Arditti, J., Ernst, R., 1993. Micropropagation of Orchids. John Wiley & Sons, New York.
- Assis, A.M., Faria, R.T.D., Unemoto, L.K., Colombo, L.A., 2008. Cultivo de *Oncidium baueri* Lindley (Orchidaceae) em substratos a base de coco. Ciência e Agrotecnologia 32, 981-985.
- Barros, F. Orchidaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/florado-brasil/FB179>>. Acesso em: 02 ago. 2017.
- Berlyn G.P., Miksche, J.P., 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. Ames: Iowa State University.
- Endres Junior, D., Sasamori, M.H., Droste, A., 2014. *In vitro* propagation of *Anathallis adenochilla* (Loefgr.) F. Barros (Orchidaceae), a species endemic to southern and southeastern Brazil. Acta Botanica Brasilica 28, 489-494.
- Ferreira, de M.W., Vasconcelos, M.C., Silva, C.C.N., Oliveira, H.R., Suzuki, R.M., 2017. Asymbiotic germination, multiplication and development of *Alatiglossum fuscopetalum* (Orchidaceae) as affected by culture medium, sucrose and growth regulators. Iheringia 72, 57-65.
- Gallo, F.R., Souza, L.A., Milaneze-Gutierre, M.A., Almeida, O.J., 2016. Seed structure and *in vitro* seedling development of certain *Laeliinae* species (Orchidaceae). Revista Mexicana de Biodiversidad 87, 68-73.
- Gomes, L.R.P., Franceschi, C.D.R.B., Ribas, L.L.F., 2015. Micropropagation of *Brasiliidium forbesii* (Orchidaceae) through transverse and longitudinal thin cell layer culture. Acta Scientiarum. Biological Sciences 37, 143-149.
- Hosomi, S.T., Santos, R.B., Custódio, C.C., Seaton, P.T., Marx, P.R., Machado-Neto, N.B., 2011. Pre-conditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. Seed Science and Technology 139, 78–189.
- Huh, Y.S., Lee, J.K., Nam, S.Y., Hong, E.Y., Paek, K.Y., Son, S.W., 2016. Effects of altering medium strength and sucrose concentration on *in vitro* germination and seedling growth of *Cypripedium macranthos* Sw. Journal of Plant Biotechnology, 43, 132-137.
- Johansen, D. A., 1940. Plant microtechnique. London: McGraw-Hill Book Company, Inc. 530 p.

- Johnson, T.R.; Kane, M.E., 2007. Asymbiotic germination of ornamental *Vanda*: *in vitro* germination and development of three hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 91, 251-261.
- Kauth, P.J., Dutra, D., Johnson, T.R., Stewart, S. L., Kane, M.E., Vendrame, W., 2008. Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination. In: Teixeira da Silva, S.A. (Ed.) *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topic issues*. Global Science Books, Isleworth, pp 375-391.
- Knudson, L., 1946 A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin* 14, 214-217.
- Kraus, J.E., Kerbauy, G.B., Monteiro, W.R., 2006. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb.f. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. *Hoehnea* 33, 177-184.
- Lauzer, D., Renaut, S., St-Arnaud, M., Barabé, D. 2007. *In vitro* asymbiotic germination, protocorm development, and plantlet acclimatization of *Aplectrum hyemale* (Muhl. ex Willd.) Torr.(Orchidaceae). *The Journal of the Torrey Botanical Society*, 134, 344-348.
- Lee, Y.I., Yeung, E.C., Lee, N., Chung, M.C., 2008. Embryology of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa*: embryo development. *Botanical Studies* 49, 139-146.
- Lloyd, G., McCown, B.H., 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagators' Society* 30, 421-427.
- Maguire, J. D. 1962. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2, 176-177.
- McCown, B.H., Sellmer, J.C., 1987. General media and vessels suitable for woody plant culture. In: *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Springer, Netherlands, pp.4-16.
- Millner, H.J., Obeng, A., Mccrea, A.R., Baldwin, T.C., 2008. Axenic seed germination and *in vitro* seedling development of *Restrepia brachypus* (Orchidaceae). *The Journal of the Torrey Botanical Society* 135, 497-505.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B., Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853-858.
- O'brien, T.P., Feder, N., Mccully, M. E., 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59, 368-373.

- Pacek-Bieniek, A., Dyduch-Siemińska, M., Rudaś, M., 2010. Influence of activated charcoal on seed germination and seedling development by the asymbiotic method in *Zygostates grandiflora* (Lindl.) Mansf. (Orchidaceae). *Folia Horticulturae* 2, 45-50.
- Pan, M.J., van Staden, J., 1998. The use of charcoal in vitro culture – a review. *Plant Growth Regulation* 26, 155–163.
- Pridgeon, A.M., Blanco, M., Gomes, R.S., Grayer, R., Hermans, J., Stenzel, H., Veith, N.C., 2005. Subtribe Pleurothallidinae. In: Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W., Rasmussen, F. N. 1995. *Genera Orchidacearum*. New York: Oxford University Press, pp. 319-422.
- Rasmussen, H., Andersen, T.F., Johansen, B., 1990. Temperature sensitivity of *in vitro* germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus. *Plant, Cell & Environment* 13, 171-177.
- Santos, S.A., Smidt, E.C., Padial, A.A., Ribas, L.L.F., 2016. Asymbiotic seed germination and in vitro propagation of *Brasiliorchis picta*. *African Journal of Biotechnology* 15, 134-144.
- Sasamori, M.H.; Endres Junior, D., Droste, A. Asymbiotic culture of *Cattleya intermedia* Graham (Orchidaceae): the influence of macronutrient salts and sucrose concentrations on survival and development of plantlets.
- Seaton, P., Kendon, J.P., Pritchard, H.W., MurtiPuspitaningtyas, D., Marks, T.R., 2013. Orchid conservation: the next ten years. *Lankesteriana* 13, 1-2.
- Swarts, N.D., Dixon, K.W., 2009. Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. *Trends in Plant Science* 14, 590-598.
- Thomas, T. D., 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26, 618-631.
- Tremblay, R.L., Ackerman, J.D., Zimmerman, J.K., Calvo, R.N., 2004. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society* 84, 1-54.
- Udomdee, W., Wen, P., Lee, C.Y., Chin, S.W., Chen, F.C., 2014. Effect of sucrose concentration and seed maturity on in vitro germination of *Dendrobium nobile* hybrids. *Plant Growth Regulation* 72, 249-255.
- Vasudevan, R., Van Staden J., 2010. *In vitro* asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. *Scientia Horticulturae* 123, 496-504.
- Vudala, S.M., Ribas, L.L.F., 2017. Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae). *South African Journal of Botany* 108, 1-7.

Yaseen, M., Ahmad, T., Sablok, G., Standardi, A., Hafiz, I.A., 2013. Role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. Molecular Biology Reports, 40, 2837-2849.

Yeung, E.C. 2017. A perspective on orchid seed and protocorm development. Botanical Studies, 58, 33.



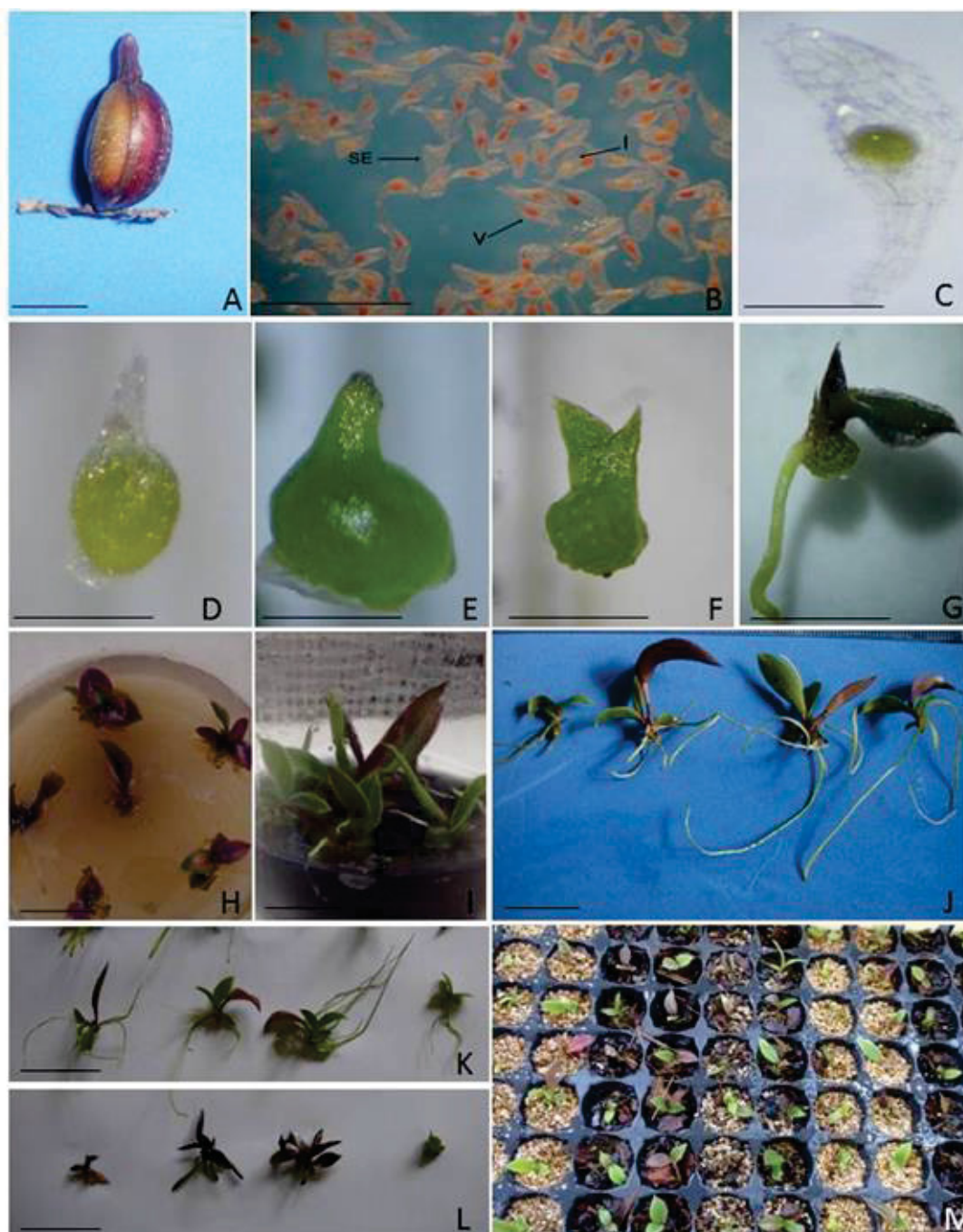


Figura 1. Germinação *in vitro* de *Acianthera prolifera*. A. cápsula madura (barra: 1 cm). B. avaliação do teste do tetrazólio v= semente com embrião viável, i= inviável, se= sem embrião. (Barra: 1 mm). C. semente com embrião clorofilado e testa intacta; D. semente com testa rompida/protocormo clorofilado. E. protocormo com ápice. F. protocormo com folha. (C – F: barra: 2 mm). G. protocormo com duas folhas e raiz (plântula) (barra: 3 mm). H. plântulas com exsudação fenólica cultivadas em meio WPM. I. plântulas em meio WPM acrescido de carvão ativado. J. plântulas cultivadas em meio WPM, com diferentes concentrações de carvão ativado (esquerda para direita: 0, 1 g L<sup>-1</sup>, 2 g L<sup>-1</sup> e 4 g L<sup>-1</sup>). K e L. plântulas desenvolvidas em meio WPM. L. e MS/2 acrescido de sacarose (0, 15, 30 e 60 g L<sup>-1</sup>). M. mudas aclimatizadas em casa de vegetação (H-L: barra: 1 cm).



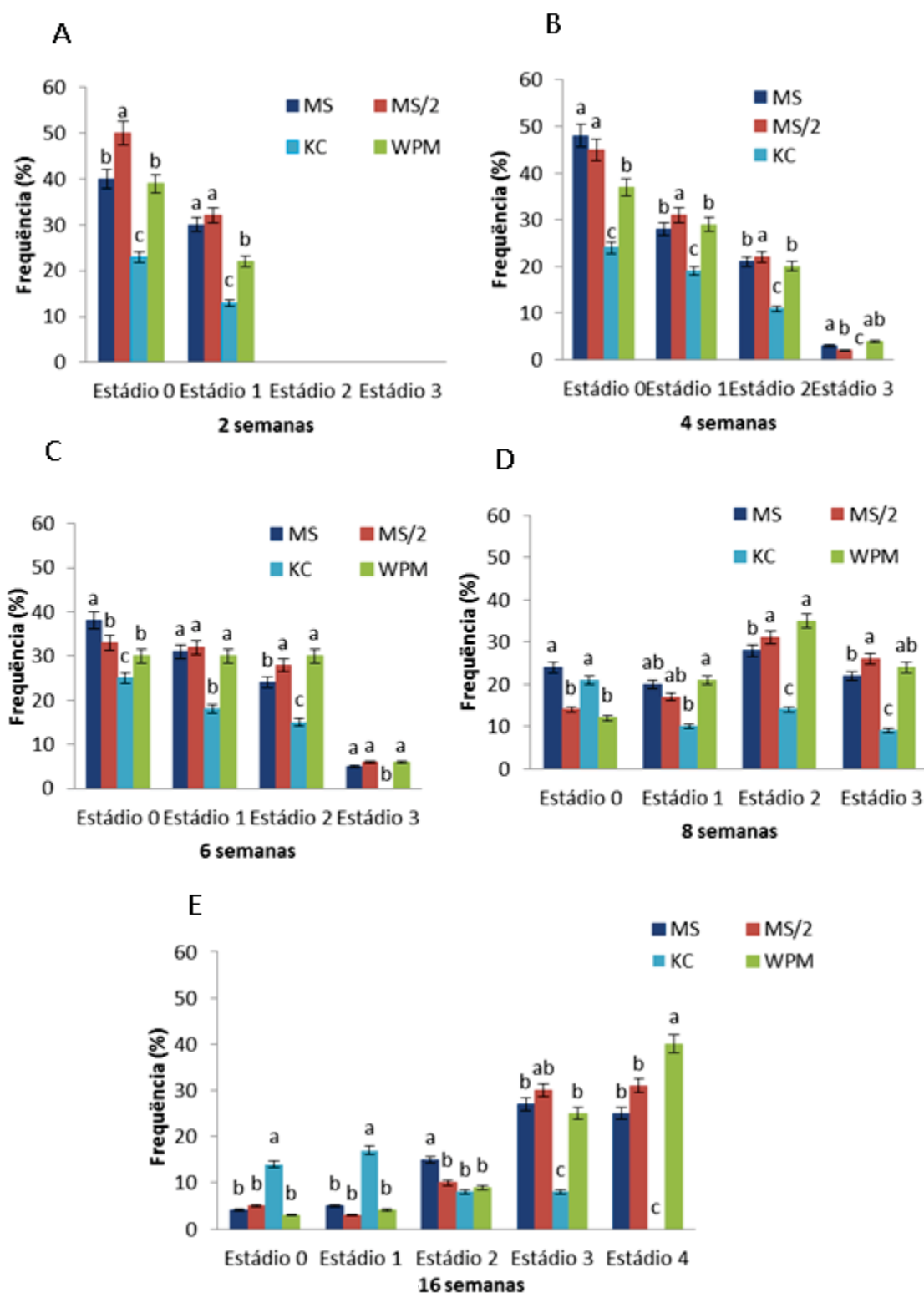


Figura 2. Frequência (%) dos estádios de desenvolvimento dos protocormos de *Acianthera prolifera*, cultivados *in vitro* por duas (A), quatro (B), seis (C), oito (D) e dezesseis (E) semanas em diferentes meios de cultura. estágio 0: semente com embrião e testa intacta, 1: testa rompida/protocormo clorofilado (germinação), 2: protocormo com ápice, 3: protocormo com uma ou duas folhas, 4: protocormo com duas ou mais folhas e raiz (plântula).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

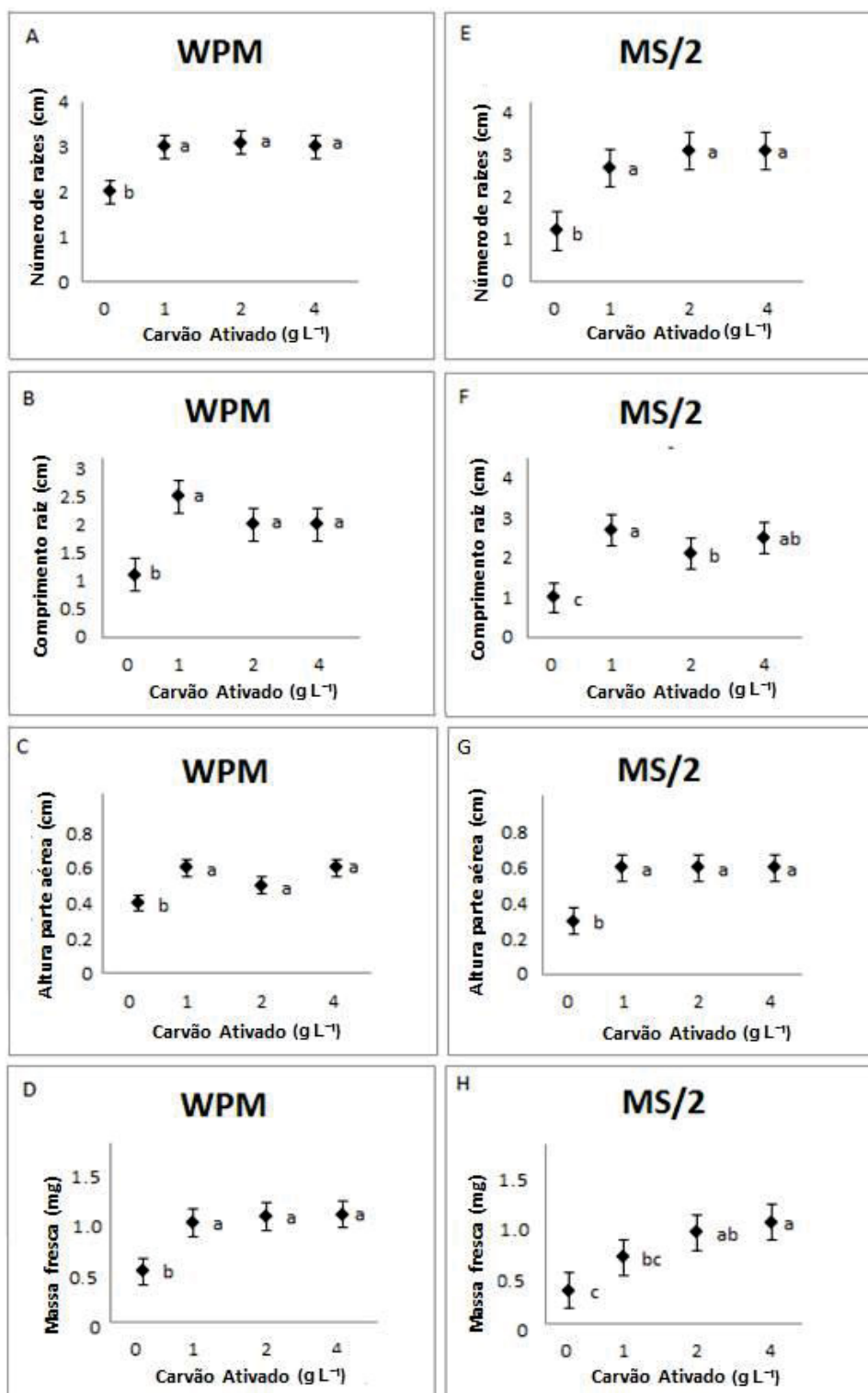


Figura 3. Alongamento e desenvolvimento de plântulas de *Acianthera prolifera* provenientes da germinação *in vitro* após três meses de cultivo em meio de cultura WPM e MS/2, acrescido de carvão ativado.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal Wallis a 1% de probabilidade. Barras verticais representam medianas seguidas de erro padrão.

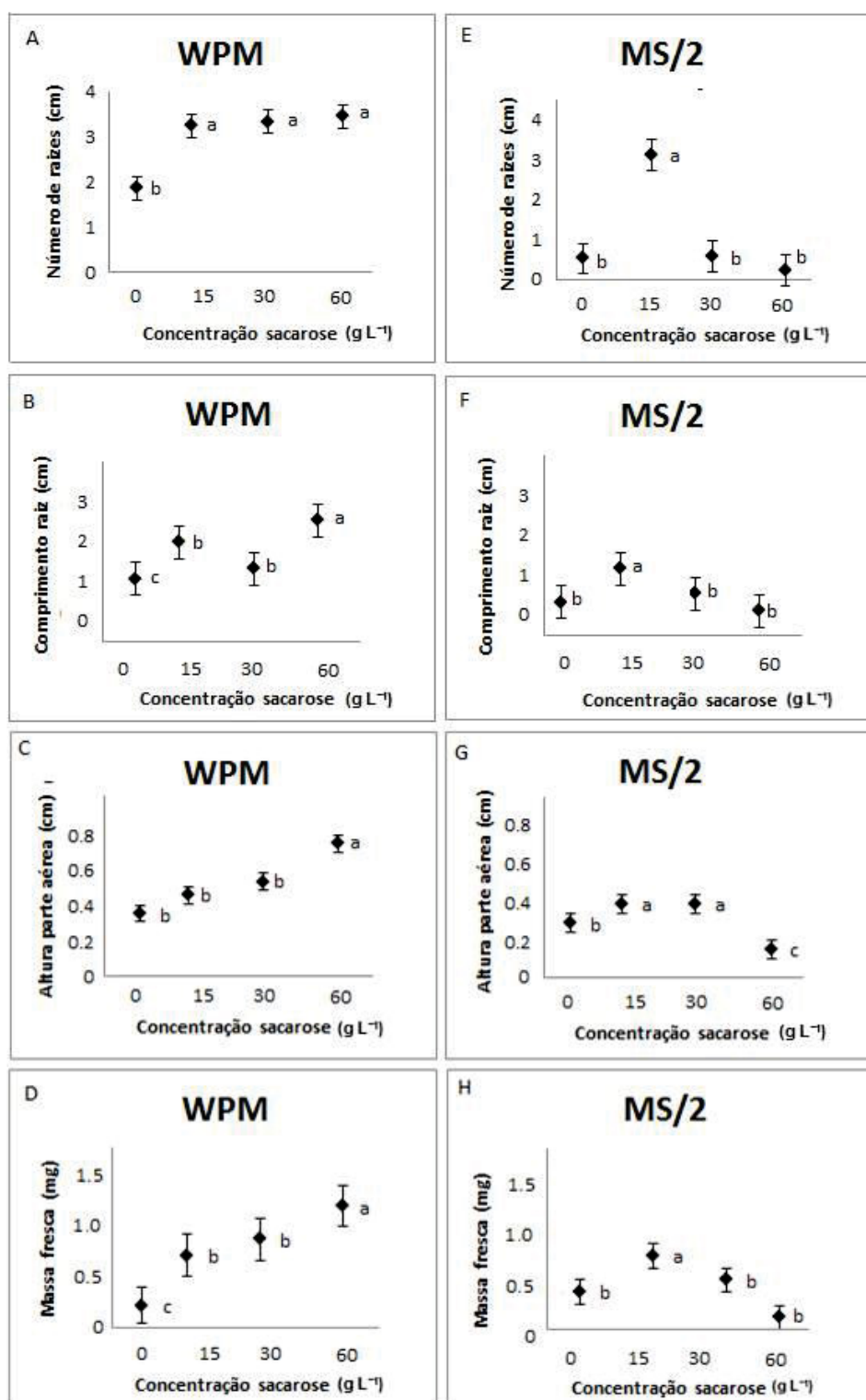


Figura 4. Alongamento e desenvolvimento de plântulas de *Acianthera prolifera* provenientes da germinação *in vitro*, após seis meses de cultivo em meio de cultura WPM e MS/2, acrescido de sacarose. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal Wallis a 1% de probabilidade. Barras verticais representam mediana seguida de erro padrão.

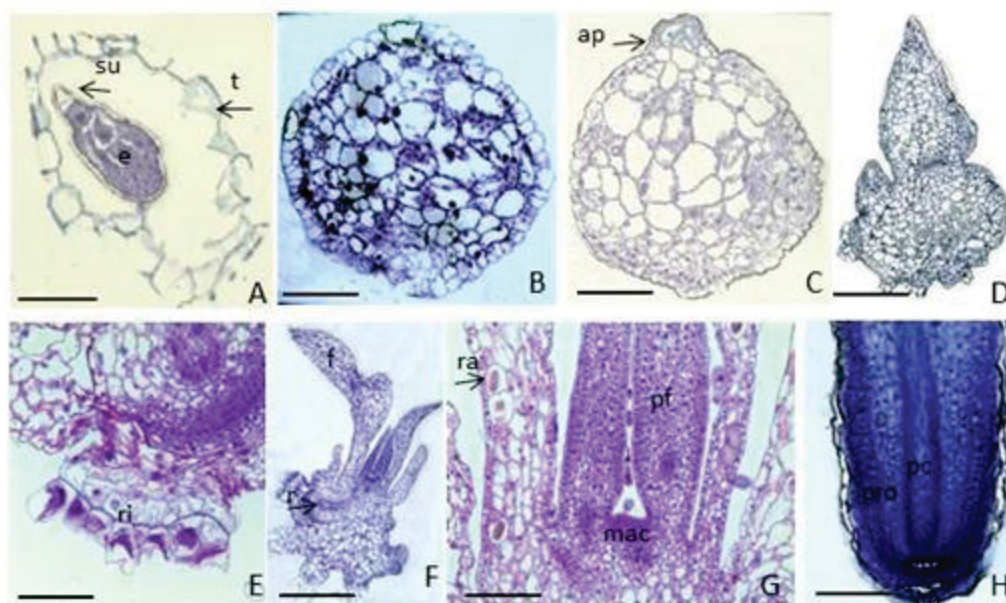


Figura 5. Secções longitudinais da semente e de protocormos de *Acianthera prolifera* corados com azul de toluidina. A. aspecto geral da semente com embrião (e) e suspensor (su) envolto pela testa (t). B. Protocormo clorofilado. C. protocormo com formação de ápice (ap). D. protocormo com formação dos primórdios foliares (pf) e desenvolvimento dos rizóides. A-D: barra: 100 µm. E. rizóides unicelulares. F. protocormo com folhas (f) e origem da raiz endógena. G. visualização do meristema apical (mac), primórdios foliares (pf) e desenvolvimento das folhas com idioblastos com ráfides (ra) . E-G: barra: 200 µm. H. raiz com procâmbio (pc), promeristema (pm), protoderme (pro) e coifa (co). Barra: 500 µm.

Tabela 1. Germinação de sementes e estádios de desenvolvimento dos protocormos de *Acianthera prolifera*.

Estádios	Descrição
0	Semente com embrião clorofilado e testa intacta
1	Testa rompida/protocormo clorofilado (germinação)
2	Protocormo com ápice e/ ou rizóides
3	Protocormo com uma ou duas folhas
4	Protocormo com duas ou mais folhas e raiz (plântula)

Tabela 2. Porcentagem total de sementes germinadas de *Acianthera prolifera*, cultivadas em diferentes meios de cultura durante duas, quatro, seis, oito e doze semanas de cultivo *in vitro*.

Meios de cultura	Porcentagem total de germinação (%) (semanas)				
	2	4	6	8	12
MS	30 a	52 a	60 b	70 b	72 b
MS/2	32 a	55 a	66 a	74 b	74 b
KC	13 c	30 b	33 c	33 c	36 c
WPM	22 b	53 a	66 a	80 a	79 a

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Tabela 3. Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Acianthera prolifera*, cultivadas em diferentes meios de cultura durante duas, quatro, seis, oito e doze semanas de cultivo *in vitro*.

Meios de cultura	IVG – Semanas				
	2	4	6	8	12
MS	15,42 a	10,17 a	6,59 b	6,09 b	1.49 b
MS/2	17,75 a	8,26 ab	3,80 c	4,38 b	1.69 b
KC	6,45 c	3,28 c	3,03 c	5,39 b	7.48 a
WPM	10,94 b	6,26 ab	8,47 a	9,06 a	2.49 b

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Tabela 4. Sobrevivência de plantas de *Acianthera prolifera*, cultivadas em diferentes substratos e mantidas em casa de vegetação, após doze semanas de aclimatização.

Substratos	Sobrevivência (%)
T1: Fibras de coco, casca de <i>Pinus</i> , carvão vegetal	46,66 b <sup>1</sup>
T2: Vermiculita	68,33 b
T3: T1+T2 (1:1)	95,00 a

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

## Anexos

Anexo 1- Composição química dos meios de cultura utilizados na germinação de *Acianthera prolifera* em  $\text{mg L}^{-1}$ .

Componentes	MS	MS/2	WPM	KC
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	-	-	500
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	185	370	250
$\text{K}_2\text{SO}_4$	-	-	990	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	220	96	-
$\text{KNO}_3$	1900	950	-	-
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	-	556	1000
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	825	400	-
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	85	170	250
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,3	13,9	27,8	25
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37,3	18,65	33,6	-
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	11,15	-	-
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	-	22,3	7,5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	4,3	8,6	0,331
$\text{MoO}_3$	-	-	-	0,016
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,012	0,25	0,0624
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,012	-	-
KI	0,83	0,41	-	-
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2	3,1	6,2	0,056
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,12	0,25	-
Mio-inositol	100	100	100	-
Ácido Nicotínico	0,5	0,5	0,5	-
Piridoxina HCl	0,5	0,5	0,5	-
Tiamina HCl	0,1	0,1	1	-
Glicina	2	2	2	-
Sacarose	30000	30000	30000	30000
Ágar	5600	5600	5600	5600



## REFERÊNCIAS FINAIS

- ALVAREZ, M.R.; SAGAWA, Y.; A histochemical study of embryo development in *Vanda* (Orchidaceae). **Caryologia** 18, 251-261, 1965.
- APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 161, p. 105-121, 2009.
- ARDITTI, J.; MICHAUD, J. D.; HEALEY, P. L. Morphometry of orchid seeds. *I. Paphiopedilum* and native California and related species of *Cypripedium*. **American Journal of Botany**, v. 66, p. 1128-1137, 1979.
- ARDITTI, J. **Orchid biology: reviews and perspectives**, v. 5. Portland: Timber Press, 1990. p. 159-206.
- ARDITTI, J.; ERNEST. R. **Micropropagation of orchids**. New York: John Wiley and Sons. 1992. 682 p.
- ARDITTI, J.; ERNST, R.; Micropropagation of Orchids. John Wiley & Sons, New York. 1993.
- AYBEKE, M. Morphological and histochemical investigations on *Himantoglossum robertianum* (Loisel.) P. Delforge (Orchidaceae) seeds. **Plant systematics and evolution**, v. 300, n. 1, p. 91-97, 2014.
- ASSIS, A.M.; FARIA, R.T.D.; UNEMOTO, L.K.; COLOMBO, L.A. Cultivo de *Oncidium baueri* Lindley (Orchidaceae) em substratos a base de coco. *Ciência e Agrotecnologia* 32, 981-985, 2008.
- BARROS, f. Orchidaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 02 ago. 2017.
- BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L.; FURTADO, S.G.; NARDY, C.; AZEVEDO, C.O.; GUIMARÃES, L.R.S. 2015. Orchidaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>> Acesso em: 11 set. 2017.
- BERLYN G.P.; MIKSCHE, J.P.; Botanical microtechnique and cytochemistry. Ames: Iowa State University, 1976.
- CHASE, M W.; PIPPEN, J. S. Seed morphology in the Oncidiinae and related subtribes (Orchidaceae). **Systematic Botany**, v. 13, p. 313-323, 1988.
- ENDRES JUNIOR, D.; SASAMORI, M.H.; DROSTE, A. *In vitro* propagation of *Anathallis adenochilla* (Loefgr.) F. Barros (Orchidaceae), a species endemic to southern and southeastern Brazil. **Acta Botanica Brasilica** 28, 489-494, 2014.



FERREIRA, W. M.; VASCONCELOS, M. C.; SILVA, C. C. N.; OLIVEIRA, H. R.; SUZUKI, R. M. Asymbiotic germination, multiplication and development of *Alatiglossum fuscopetalum* (Orchidaceae) as affected by culture médium, sucrose and growth regulators. **Iheringia**, v. 72, p. 57-65, 2017.

GAMARRA, R.; DORDA, E.; SCRUGLI, A.; GALAN, P.; ORTUNEZ, E. Seed micromorphology in the genus *Neotinea* Rchb. f.(Orchidaceae, Orchidinae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 153, n. 2, p. 133-140, 2007.

GALLO, F.R.; SOUZA, L.A.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A.; ALMEIDA, O.J.; Seed structure and *in vitro* seedling development of certain *Laeliinae* species (Orchidaceae). **Revista Mexicana de Biodiversidad** 87, 68-73, 2016.

GOMES, R. S. Artificial key to the genera of Pleurothallidinae. In: PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P.J.; CHASE, M.W.; RASMUSSEN, F.N. **Genera Orchidacearum**. v. 4. New York: Oxford University Press, p. 325-328, 2005.

GOMES, L. R. P. FRANCESCHI, C. R. B.; RIBAS, L. L. F. Micropropagation of *Brasilidium forbesii* (Orchidaceae) through transverse and longitudinal thin cell layer culture. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 37, n. 2, p. 143-149, 2015.

GUPTA, A. Studies on *Malaxis acuminata* d. don (= *Microstylis wallichii* lindl.) a medicinally important orchid. **Journal of Global Research Computer Science and Technology**, v. 4, p. 1-11, 2016.

HEALEY, P. L.; MICHAUD, J. D.; ARDITTI, J. Morphometry of orchid seeds. III. Native Claifornia and related species of *Goodyera*, *Piperia*, *Platanthera* and *Spiranthes*. **American Journal of Botany**, p. 508-518, 1980.

HOSOMI, S.T.; SANTOS, R.B.; CUSTÓDIO, C.C.; SEATON, P.T.; MARX, P.R.; MACHADO-NETO, N.B.; Pre-conditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. **Seed Science and Technology**, 139, 78–189, 2011.

HUH, Y. S.; LEE, J. K.; NAM, S. Y.; HONG, E. Y.; PAEK, K. Y.; SON, S. W. Effects of altering medium strength and sucrose concentration on *in vitro* germination and seedling growth of *Cypripedium macranthos* Sw. **Journal Plant Biotechnology**, v. 43, p. 132-137, 2016.

JOHANSEN, D. A., 1940. Plant microtechnique. London:McGraw-Hill **Book Company**, Inc. 530 p.

JOHNSON, T.R.; KANE, M.E. Asymbiotic germination of ornamental *Vanda*: *in vitro* germination and development of three hybrids. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 91, 251-261, 2007.

KAUTH, P. J.; DUTRA, D.; JOHNSON, T. R.; STEWART, S. L.; KANE, M. E.; VENDRAME, W. A. Techniques and applications of in vitro orchid seed germination. In: TEIXEIRA DA SILVA, J. A. (Ed.) Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues. Isleworth: **Global Science Books**, p. 375-391, 2008.

KARREMANS, A. P. Genera Pleurothallidinarum: an updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae. **Lankesteriana**, v.16, n.2, p.219 - 241, 2016.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.

KENDON, J. P.; RAJAOVELONA, L.; SANDFORD, H.; FANG, R.; BELL, J.; SARASAN, V. Collecting near mature and immature orchid seeds for ex situ conservation: 'in vitro collecting' as a case study. **Botanical Studies**, v. 58, p. 1-14, 2017.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Society Bulletin** 14, 214-217, 1946.

KRAUS, J.E.; KERBAUY, G.B.; MONTEIRO, W.R. Desenvolvimento de protocormos de *Catasetum pileatum* Rchb.f. *in vitro*: aspectos estruturais e conceituais. **Hoehnea**, v. 33, p.177-184, 2006.

LAUZER, D.; RENAUT, S.; ST-ARNAUD, M.; BARABÉ, D. *In vitro* asymbiotic germination, protocorm development, and plantlet acclimatization of *Aplectrum hyemale* (Muhl. ex Willd.) Torr.(Orchidaceae). **The Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 134, p. 344-348, 2007.

LEE, Y.I.; YEUNG, E.C.; LEE, N.; CHUNG, M.C. Embryology of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa*: embryo development. **Botanical Studies**, v. 49, p. 139-146 2008.

LLOYD, G.; McCOWN, B. H. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Proceedings of the International Plant Propagators' Society**, v. 30, p.421-427, 1980.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v.59, p.368-373, 1965.

MACEDO, M. C.; ROSA, D. B. C. J.; SOARES, J. S.; TATARA, M. B.; HOFFMANN, N. T. K.; ROSA, Y. B. C. J. Armazenamento de sementes e aclimatização de *Brassavola tuberculata* Hook. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n.6, p. 2883-2894, 2014.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.

MCCOWN, B.H.; SELLMER, J.C. General media and vessels suitable for woody plant culture. In: Cell and Tissue Culture in Forestry. **Springer**, Netherlands, p.4-16, 1987.

MENINI NETO, L; DOCHA NETO. A. Redescoberta e tipificação de *Octomeria leptophylla* Barb. Rodr. (Orchidaceae), micro-orquídea endêmica de Minas Gerais, Brasil. **Rodriguesia**, v. 60, n. 2, p. 461-465, 2009.

MILLNER, H.J.; OBENG, A.; MCCREA, A.R.; BALDWIN, T.C. Axenic seed germination and *in vitro* seedling development of *Restrepia brachypus* (Orchidaceae). The **Journal of the Torrey Botanical Society**, v.135, p.497-505, 2008.

MORAES, L.M.; CAVALCANTE, L.C.D.; FARIA, R.T. Substratos para aclimatização de plântulas de *Dendrobium nobile* Lindl. (Orchidaceae) propagadas *in vitro*. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, p. 1397-1400, 2002.

MOHANTY, P.; DAS, M. C.; KUMARIA, S.; TANDON, P. High-efficiency cryopreservation of the medicinal orchid *Dendrobium nobile* Lindl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 109, n. 2, p. 297-305. 2012.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

PACEK-BIENIEK, A.; DYDUCH-SIEMIŃSKA, M.; RUDAŚ, M. Influence of activated charcoal on seed germination and seedling development by the asymbiotic method in *Zygostates grandiflora* (Lindl.) Mansf. (Orchidaceae). **Folia Horticulturae**, v. 22, n. 2, p. 45-50, 2010.

PAN, M. J.; VAN STADEN, J. The use of charcoal *in vitro* culture – A review. **Plant Growth Regulation**, v. 26, n. 3, p. 155-163, 1998.

PAUL, S; KUMARIA, S; TANDON, P. An effective nutrient medium for asymbiotic seed germination and large-scale *in vitro* regeneration of *Dendrobium hookerianum*, a threatened orchid of northeast India. **AoB Plants**, v. 2012, p. 32, 2012.

PRIDGEON, A.M; BLANCO, M; GOMES, R.S; GRAYER, R; HERMANS, J; STENZEL, H; VEITH, N.C. Subtribe Pleurothallidinae. In: PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M.W; RASMUSSEN, F. N. (eds.). **Genera Orchidacearum**. New York: Oxford University Press, p. 319-422, 2005.

PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P.J.; CHASE, M.W.; RASMUSSEN, F.N. **Genera Orchidacearum**. Oxford: Oxford University Press, 1999.

RASMUSSEN, H.; ANDERSEN, T.F.; JOHANSEN, B. Temperature sensitivity of *in vitro* germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus. **Plant, Cell & Environment**, v.13, p.171-177, 1990.

RITTIRAT, S.; THAMMASIRI, K.; TE-CHATO, S. Effect of media and sucrose concentrations with or without activated charcoal on the plantlet growth of *P. cornucervi* (Breda) Blume & Rchb.f. **Journal of Agricultural Technology**, v. 8, p. 2077-2087, 2012.

SANTOS, S. A.; SMIDT, E. C.; PADIAL, A. A.; RIBAS, L. L. F. Asymbiotic seed germination and *in vitro* propagation of *Brasiliorchis picta*. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, p.134-144, 2016.

SASAMORI, M.H.; ENDRES JUNIOR, D.; DROSTE, A. Asymbiotic culture of *Cattleya intermedia* Graham (Orchidaceae): the influence of macronutrient salts and sucrose concentrations on survival and development of plantlets. SEATON, P.; KENDON, J.P.; PRITCHARD, H.W.; MURTIPUSPITANINGTYAS, D.; MARKS, T.R. Orchid conservation: the next ten years. **Lankesteriana**, v. 13, p.1-2, 2013.

SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, v. 59, n. 2, p.185-191, 2012.

SEATON, P.; KENDON, J. P.; PRITCHARD, H. W. PUSPITANINGTYAS, D. M.; MARKS, T. R. Orchid conservation: the next ten years. **Lankesteriana**, v.13, p. 93-103, 2013.

STERN, W. L.; PRIDGEON, A. M. Ramicaul, a better term for the pleurothallid "secondary stem". **American Orchid Society Bulletin**, v. 53, n.4, p. 397-401, 1984.

SUZUKI, R. M.; MOREIRA, V. C.; PESCADOR, R.; FERREIRA, W. M. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina*. **In Vitro Cellular e Development Biology - Plant**, v. 48, n.5, p. 500-511, 2012.

SWAMY, K. K.; KUMAR, H. K.; RAMAKRISHNA, T. M.; RAMASWAMY, S. N.. Studies on seed morphometry of epiphytic orchids from Western Ghats of Karnataka. **Taiwania-Taipei**, v. 49, p. 124-140, 2004.

SWARTS, N.D.; DIXON, K.W. Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. **Trends in Plant Science**, v.14, p. 590-598, 2009.

THORPE, T.; STASOLLA, C.; YEUNG, E. C, KLERK, G. J de, ROBERTS, A; GEORGE, E. F.. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: GEORGE, E.F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. 3 ed; Dordrecht: Springer, p. 115-173, 2008.

TREMBLAY, R.L.; ACKERMAN, J.D.; ZIMMERMAN, J.K.; CALVO, R.N.; Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. **Biological Journal of the Linnean Society** 84, 1-54, 2004.

TSUTSUMI, C.; YUKAWA, T.; LEE, N. S.; LEE, C. S.; KATO, M. Phylogeny and comparative seed morphology of epiphytic and terrestrial species of *Liparis* (Orchidaceae) in Japan. **Journal of Plant Research**, v. 120, n. 3, p. 405-412, 2007. UDOMDEE, W.; WEN, P.; LEE, C.Y.; CHIN, S.W.; CHEN, F.C.; Effect of sucrose concentration and seed maturity on *in vitro* germination of *Dendrobium nobile* hybrids. **Plant Growth Regulation** 72, 249-255, 2014.

VASUDEVAN, R.; VAN STADEN J. *In vitro* asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. **Scientia Horticulturae**, v. 123, p.496-504, 2010.

VIJ, S. P.; PATHAK, P.; KAUR, P.; SHARMA, M. Somatic/artificial seeds in orchids. **Orchid News**, v. 8, n. 9, p. 12-13, 1992.

VUDALA, S. M.; RIBAS, L. L. F. Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae). **South African Journal of Botany**, v.108, p.1-7, 2017.

ZAHARA, M.; DATTA, A.; BOONKORKAEV, P.; MISHRA, A. The effects of different media, sucrose concentrations and natural additives on plantlet growth of *Phalaenopsis* hybrid "Pink". **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, p. 160-149, 2017.

YASEEN, M., AHMAD, T.; SABLOK, G., STANDARDI, A.; HAFIZ, I.A. Role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 2837-2849, 2013.

YEUNG, E. C.; LAW, S. K. Embryology of *Calypso bulbosa*. II. Embryo development. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, n. 3, p. 461-468, 1992.

YEUNG, E.C.; A perspective on orchid seed and protocorm development. **Botanical Studies**, 58, 33, 2017.